VISIT…

LANZAROTE

Caliente.COM

Л.Страйер

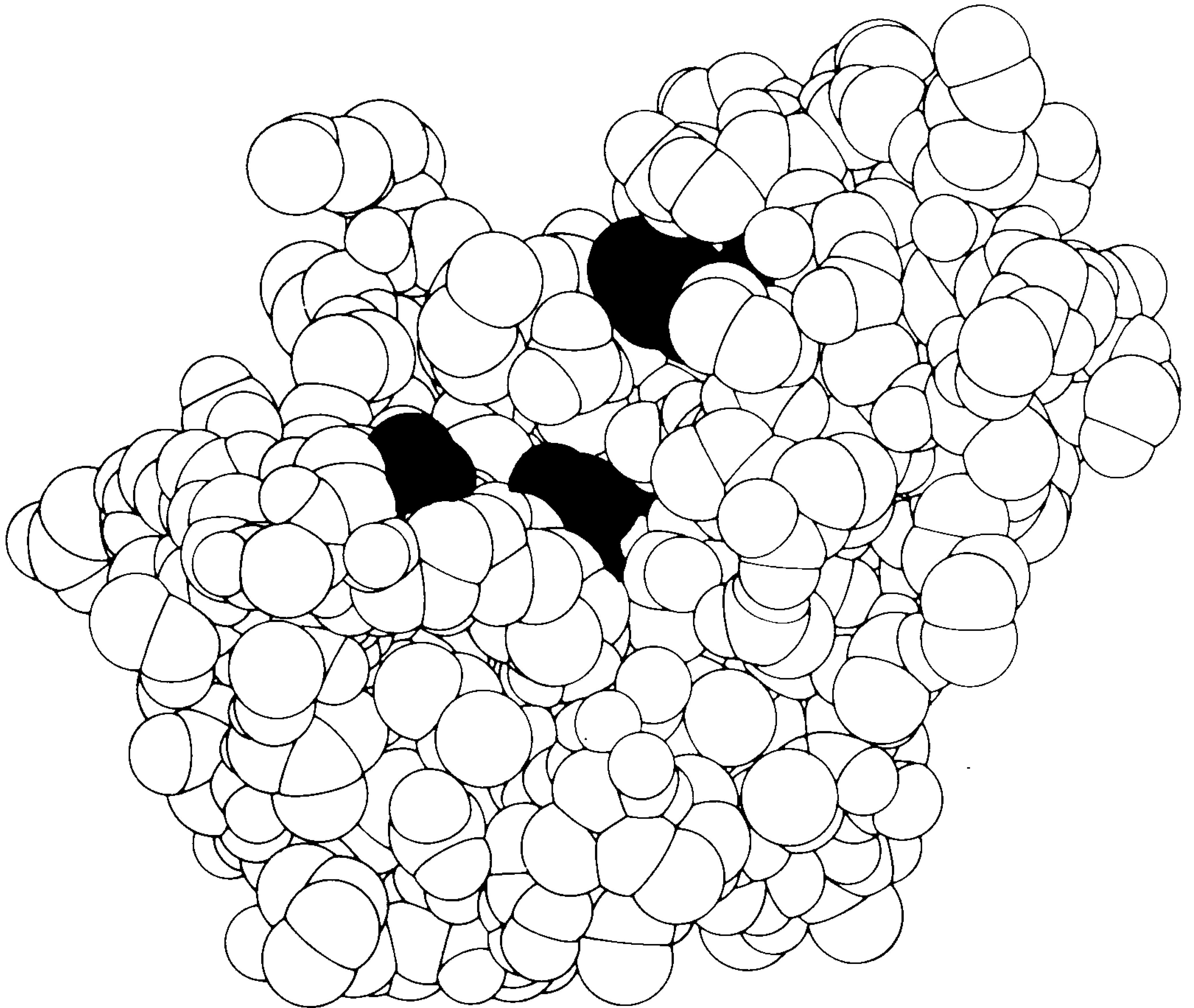
БИОХИМИЯ

Second Edition

BIOCHEMISTRY

Lubert Stryer
Stanford University

W.H.Freeman and Company
San Francisco



Л.Страйер

В 3-х томах

БИОХИМИЯ

Перевод с английского канд. биол. наук М.Д.Гроздовой,

Под редакцией академика С.Е.Северина

том 1

Москва «Мир»
1984

ББК 28.072
С-83
УДК 577.1

Страйер Л.

С-83 Биохимия: Пер. с англ.– М.: Мир, 1984.– Т. 1–232 с., ил.

В книге ученого из США на самом современном научном уровне рассмотрены основные проблемы биохимии и молекулярной биологии. На русском языке книга выходит в трех томах.

В первом томе приведены данные по строению биологических макромолекул, образованию, превращению и хранению энергии в клетке, структуре и функциям ферментов и других биологически активных белков, а также по «молекулярным» болезням.

Предназначена для биохимиков, молекулярных биологов, физиологов, химиков, медиков, для студентов, аспирантов и преподавателей биологических, химических и медицинских специальностей.

С $\frac{2001040000-164}{041(01)-84}$ подп. изд-е-84, ч. 1 **ББК 28.072**

Редакция литературы по биологии

Люберт Страйер

БИОХИМИЯ

Том 1

Ст научн. редактор Л. Г. Тер-Саркисян. Мл. научн. редактор О. А. Горгун. Художник И. Б. Кравцов. Художественный редактор Л. М. Кузнецова. Технический редактор З. И. Резник. Корректор Т. П. Пашковская.

ИБ № 3849

Сдано в набор 17.08.83 Подписано к печати 13.09.84. Формат 70 × 100/16. Бумага офсетная № 1. Печать офсетная. Гарнитура таймс. Объем 7,25 бум. л. Усл. печ. л. 18,85 Усл. кр.-отт. 75,76. Уч. изд. л. 20,87. Изд. № 4/2495. Тираж 17.100 экз. Зак. 665. Цена 2 р. 20 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО МИР
129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Можайский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
143200, г. Можайск, ул. Мира, 93.

© 1975, 1981 by Lubert Stryer

© Перевод на русский язык, «Мир», 1984

Предисловие редактора перевода

Книга Страйера представляет собой оригинальное, очень удачно составленное руководство по общей динамической биохимии, которое можно горячо рекомендовать специализирующимся по биохимии студентам университетов, аспирантам, а также преподавателям, ведущим занятия по биохимии в различных высших и средних специальных учебных заведениях. В книге отлично изложены данные о динамике превращений биологически важных соединений и подробно разобраны ферментативные основы обмена веществ и энергии. Несмотря на обстоятельность изложения и сложность приводимых, вполне современных данных по биохимии и молекулярной биологии, материал излагается настолько просто и интересно и с такими замечательными иллюстрациями, что разобраться в нем не представляет сложности даже для относительно мало подготовленного читателя. Использовать книгу Страйера как справочное издание по биохимии невозможно: в ней нет таблиц, характеризующих состав крови, мочи, органов и тканей, нет описания свойств и структуры различных биологически важных соединений, но зато строго последовательно разбирается и оценивается физиологическая значимость их превращений. Есть, как мне кажется, и упущения. Например, в книге ни слова не сказано об α- и ω-окислении жирных кислот, тогда как описание нарушения α-окисления дает возможность остановиться на одном из интересных наследственных заболеваний и обсудить процессы гидроксилирования, играющие существенную роль при различных реакциях обмена веществ. Во многих других случаях весьма уместно приводятся примеры наследственных заболеваний, связанных с выпадением синтеза того или другого фермента. В этом отношении данная книга представляет несомненный интерес и для врачей, желающих пополнить свое биохимическое образование.

С большим удовлетворением можно констатировать, что в последние годы переводная биохимическая литература пополнилась после отличного учебника А. Ленинджера такими фундаментальными руководствами, как «Биохимия» Д. Мецлера (М.: Мир, 1980) и «Основы биохимии» А. Уайта, Ф. Хендлера, Э. Смита и др. (М.: Мир, 1981). Надо думать, что среди этих книг учебное руководство Страйера займет достойное и почетное место, быстро приобретет популярность у заинтересованных читателей и выполнит таким образом важную роль в распространении и углублении биохимических знаний в нашей стране.

С. Е. Северин

Моим учителям П. Брандуэйну, Д. Харрису, Д. Смиту, Э. Блауту, Э. Парселлу

Предисловие ко второму изданию

Развитие биохимии в последние годы шло поразительно быстрым темпом. Этот прогресс расширил наши представления о молекулярных основах жизни и стимулировал развитие многих новых областей исследования. К числу важнейших направлений современной биохимии следует отнести анализ последовательности нуклеотидов в ДНК, создание и клонирование новых сочетаний генов, выяснение механизмов регуляции метаболических процессов, изучение мембранного транспорта и превращения энергии. Одна из задач, которой я руководствовался при подготовке настоящего издания,– введение в текст данных, полученных уже после выхода в свет первого издания. Я стремился улучшить качество книги как учебника, используя новый материал при обсуждении общих тем, где это было возможно, и неоднократно возвращаясь к тем или иным принципам. Я также стремился к тому, чтобы изложение предмета биохимии оставляло впечатление интеллектуальной мощи и красоты.

Я приношу благодарность Томасу Эмери, Генри Эпстайну, Александру Глейзеру, Роджеру Корнбергу, Роберту Мартину, Джеффри Склару за советы, критические замечания и поддержку в процессе подготовки этого издания. Роберт Болдуин, Чарльз Кантор, Ричард Каприоли, Дэвид Эйзенберг, Алан Фершт, Роберт Флеттерик, Герберт Фридман, Хорейс Джексон, Ричард Кейнс, Сун-Хоу Ким, Аарон Клюг, Артур Корнберг, Дэниел Кошланд, Самюэль Латт, Винсент Марчези, Дэвид Нелсон, Гарт Николсон, Вернон Ои, Роберт Рентал, Карл Родс, Фредерик Ричардс, Джеймс Ротман, Питер Сарджент, Говард Шахман, Иоахим Силиг, Эрик Шутер, Элизабет Симонс, Джеймс Спудич, Теодор Стек, Томас Стейтц, Юдит Стенн, Роберт Трелстад, Кристофер Уолш, Симон Уитни и Бернхард Уиткоп также давали мне ценные советы.

Патриция Миттельштадт отредактировала оба издания книги. Я высоко ценю ее вклад и критические замечания. Я благодарен Донне Солмон за ее замечательные рисунки. Множество прекрасных электронно-микроскопических снимков мне предоставили Дэвид Слейтон, Дэвид Дресслер, Джон Хёйзер, Линн Мерсер, Кеннет Миллер, Джордж Палладе, Нигель Ануин и Робли Уилльямс. Бетти Хоган перепечатывала рукопись и была незаменимым помощником при подготовке ее к печати. Кэри Лейден и Карен Марзотто тщательно выверили гранки. Я хочу поблагодарить также Майкла Грейвса как отличного фотографа.

Моя жена Андреа и сыновья Майкл и Дэниел охотно согласились принять эту книгу в члены нашей семьи. Я глубоко благодарен им за терпение и оптимизм. Андреа дала мне много полезных советов относительно стиля изложения и расположения материала в этом издании, так же как и в предыдущем.

Я глубоко тронут множеством писем читателей по поводу первого издания. Их соображения и критика оказались для меня весьма полезными и послужили стимулом для дальнейшей работы. Я надеюсь на продолжение этого диалога с читателями и в будущем.

Август 1980 г. Люберт Страйер

Предисловие к первому изданию

Эта книга – плод накопленного мною опыта преподавания биохимии студентам старших курсов и дипломникам, а также студентам-медикам в Йейле и Станфорде. Я ставил себе целью изложение общих принципов биохимии так, чтобы читатель усвоил основные концепции и овладел биохимической терминологией. Кроме того, мне хотелось, чтобы читатель почувствовал и оценил процесс поиска и открытия в биохимии. Фундаментальные биохимические принципы излагаются при обсуждении следующих основных тем:

1. Конформация – на примере связи между пространственной структурой белков и их биологической активностью.
2. Выработка и накопление энергии.
3. Биосинтез предшественников макромолекул.
4. Информация – накопление, передача и экспрессия генетической информации.
5. Молекулярная физиология – взаимосвязь между информацией, конформацией и метаболизмом в физиологических процессах.

Раскрытие на протяжении последних лет пространственной структуры белков, нуклеиновых кислот и других биомолекул значительно расширило наши представления о молекулярных основах жизни. Излагая этот аспект биохимии, я очень широко пользовался молекулярными моделями, чтобы создать живое представление об архитектуре и динамике на макромолекулярном уровне. Другой вдохновляющий и прекрасный аспект биохимии – это ее все возрастающая связь с медициной. Я привожу много примеров такой связи. Обсуждение молекулярных болезней, в частности серповидноклеточной анемии, или механизма действия таких лекарственных препаратов, как пенициллин, обогащает преподавание биохимии. Наконец, я постарался обрисовать некоторые новые увлекательные области современных биохимических исследований, например молекулярные основы возбудимости.

При подготовке этой книги я широко пользовался советами, критическими замечаниями и поддержкой многих коллег и учеников. Лерой Худ, Артур Корнберг, Джеффри Склар и Уилльям Вуд дали мне ценную консультацию относительно общей структуры книги. Ричард Каприоли, Дэвид Коул, Александр Глейзер, Роберт Леман и Питер Ленджиел ознакомились с большими разделами рукописи и дали очень много полезных советов. Я крайне обязан Фредерику Ричардсу за те мысли, которыми он поделился со мной относительно конформации макромолекул, и за подробные указания, как лучше изображать пространственную структуру. Дэрик Баундс, Томас Брокер, Джек Гриффит, Хью Хаксли и Джордж Палладе предоставили мне замечательные электронно-микроскопические снимки. Я также очень благодарен Ричарду Дикерсону, Дэвиду Эйзенбергу, Мойзесу Эйзенбергу, Генри Эпстайну, Джозефу Фрутону, Мишелю Голдбергу, Джеймсу Гризолиа, Ричарду Хендерсону, Харви Химелю, Дэвису Хогнессу, Дейлу Кайзеру, Самюэлю Латту, Сьюзан Лёви, Винсенту Марчези, Пиеру Муру, Аллану Озерову, Джордану Поберу, Расселу Россу, Эдварду Райху, Марку Смиту, Джеймсу Спудич, Джоан Стейтц, Томасу Стейтцу и Алану Ваггонеру, советами и критическими замечаниями которых я воспользовался при подготовке этой книги.

Приношу благодарность Государственному фонду за предоставление денежных

средств, позволивших мне приступить к написанию этой книги. В самое трудное время мне помогли Роберт Глейзер, Терран Киннан и Квигг Ньютон. Одна из задач, которую я поставил перед собой, состояла в том, чтобы достичь полного единения слова и рисунка и как можно живее и нагляднее изобразить химические превращения и пространственные структуры. Отсюда – моя особая признательность Донне Солмон, Джону Фостеру и Джейн Фостер за выполненные ими рисунки, графики и схемы. Немало людей в Йельском университете способствовало завершению моего труда. Я особенно благодарен Маргарет Бентон и Шарен Уэстин за перепечатку рукописи, Уилльяму Полларду – за фотографирование пространственных моделей и Марте Скарф за обеспечение компьютерных изображений молекулярных структур (эти изображения легли в основу многих иллюстраций). Большую помощь мне оказали также сотрудники Научной библиотеки во главе с Джоном Харрисоном.

Значительная часть книги была написана в Аспене. Я должен выразить благодарность Физическому центру в Аспене и Институту патобиологии, любезно принимавшим меня не одно лето. У меня сохранились самые теплые воспоминания об увлекательных дискуссиях по проблемам биохимии и молекулярным аспектам медицины, происходивших в прекрасном парке Института патобиологии или во время прогулок по живописным окрестностям. Большое удовольствие доставляло также посещение концертов в Аспене, особенно после целого дня интенсивной работы.

Я искренне благодарен своей жене Андреа и детям Майклу и Дэниелу за их поддержку, терпение и доброе отношение на протяжении всего того времени, пока писалась книга. Они действительно участвовали в ее рождении, процесс которого оказался длительнее, чем предполагалось. Андреа давала мне советы по поводу стиля и расположения материала, а также обратила мое внимание на замечание китайского ученого XIII века Тай-Т'уна (Tai T'ung, The Six Scripts: plinciples of Chinese writing): «Если бы я ждал совершенства, то никогда не закончил бы книгу».

Я буду рад любым замечаниям читателей.

Октябрь 1974 г. Люберт Страйер

ГЛАВА 1. Молекулы и жизнь

Биохимия – это наука о молекулярных основах жизни. Существует несколько причин тому, что в наши дни биохимия привлекает большое внимание и быстро развивается. *Во-первых, биохимикам удалось выяснить химические основы ряда важнейших биологических процессов.* Назовем, в частности, такие выдающиеся достижения, как открытие двухцепочечной спирали дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), расшифровка генетического кода, определение трехмерной структуры некоторых белков, описание основных путей метаболизма. *Во-вторых, обнаружены общие пути превращения молекул и общие принципы, лежащие в основе разнообразных проявлений жизни.* Оказалось, что столь различные организмы, как бактерия *Escherichia coli* и человек, имеют много общего на молекулярном уровне. Оба организма используют одни и те же строительные блоки для образования макромолекул; в принципе одинаково происходит передача генетической информации от ДНК к рибонуклеиновой кислоте (РНК) и далее к белкам; оба вида используют аденозинтрифосфат (АТР) в качестве энергетической валюты. *В-третьих, биохимия оказывает все более глубокое воздействие на медицину.* Так, например, определение активности ферментов играет в настоящее время важную роль в клинической диагностике. Содержание определенных ферментов в сыворотке крови может служить ценным критерием при диагностике недавно перенесенного инфаркта миокарда. Кроме того, биохимия постепенно создает основу для рационального назначения лекарственных препаратов. Исключительную важность представляет выяснение молекулярных механизмов некоторых заболеваний, например серповидноклеточной анемии или большого числа врожденных нарушений метаболизма, исследованных к настоящему времени. *В-четвертых, быстрое развитие биохимии в последние годы позволило исследователям приступить к изучению самых острых, коренных проблем биологии и медицины.* Каким образом на протяжении индивидуального развития из одной клетки возникают такие разнообразные клетки, как мышечная, нервная или печеночная? Как клетки находят друг друга при формировании сложного организма? Как контролируется рост клеток?

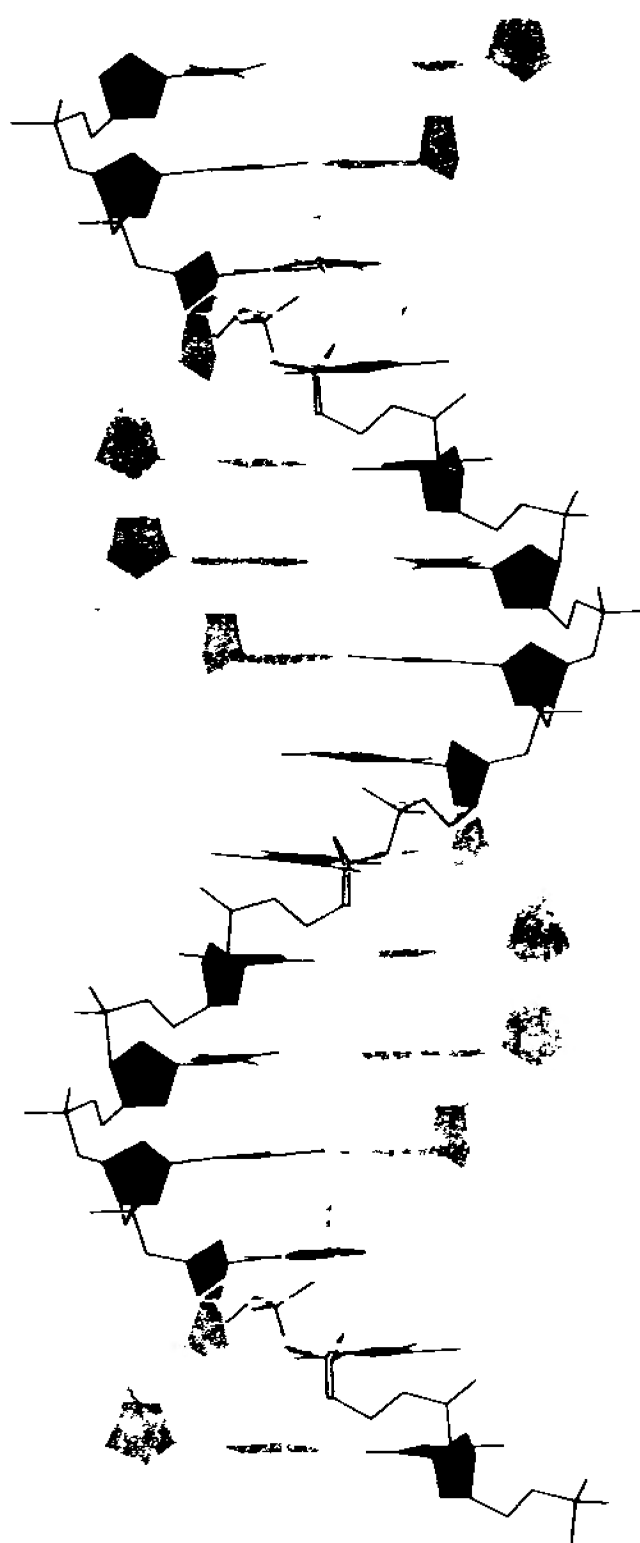


Рис. 1.1. Модель двойной спирали ДНК. Диаметр спирали около 20 Å.

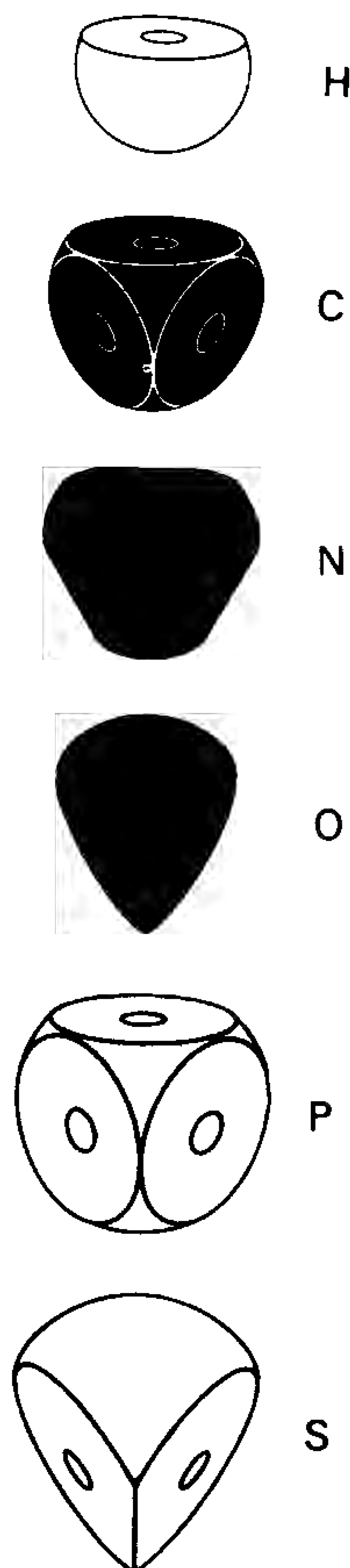


Рис. 1.2. Пространственные модели атомов водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора и серы.

Каков механизм памяти? Каким образом возникает нервный импульс в сетчатке глаза при действии света? В чем причина рака? Каковы причины шизофрении?

1.1. Молекулярные модели

Взаимосвязь между трехмерной структурой биомолекул и их биологической функцией составляет лейтмотив настоящей книги. Для описания архитектуры молекул мы воспользуемся атомарными моделями трех типов: 1) пространственными, 2) построенными из шаров и палочек и 3) скелетными. *Пространственные модели* наиболее реалистичны. Размер и конфигурация атома в пространственной модели определяется его валентностью и радиусом вандерваальсовых взаимодействий (рис. 1.2). Для обозначения атомов в моделях приняты следующие цвета:

водород – белый,
углерод – черный,
азот – синий,
кислород – красный,
фосфор – желтый,
сера – желтый.

На рис. 1.3 показаны пространственные модели некоторых простых молекул.

Модели из шаров и палочек менее точно отражают строение молекул, чем пространственные, так как в них атомы представлены в виде шариков меньшего радиуса, чем радиус вандерваальсовых взаимодействий. Однако эти модели дают более наглядное представление о расположении связей, которые в данном случае изображаются просто в виде палочек. Заостренный конец палочки указывает направление связи: расположена ли она впереди или позади плоскости рисунка. В целом такая модель лучше, чем пространственная, позволяет рассмо-

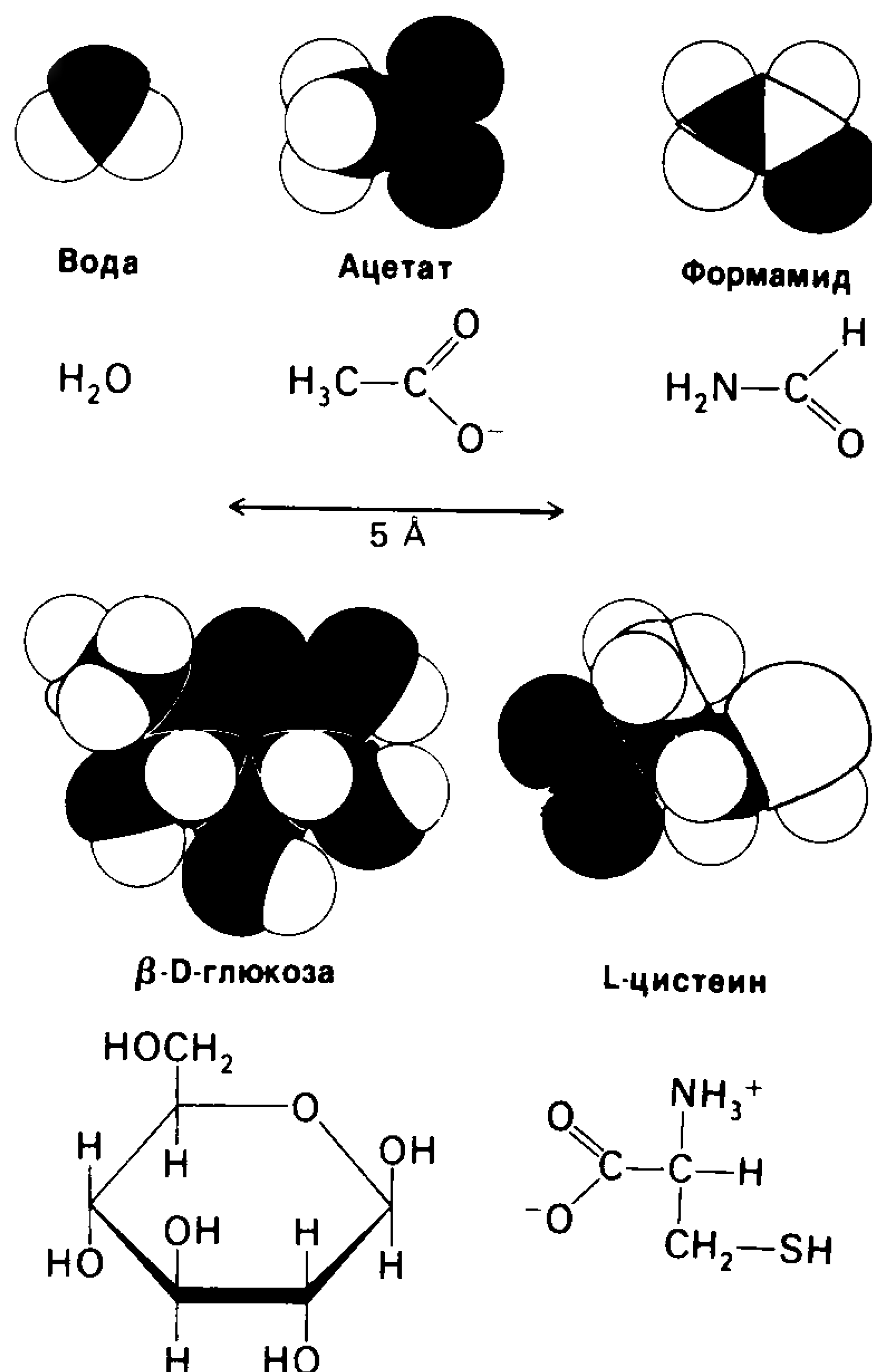


Рис. 1.3. Пространственные модели воды, ацетата, формамида, глюкозы и цистеина.

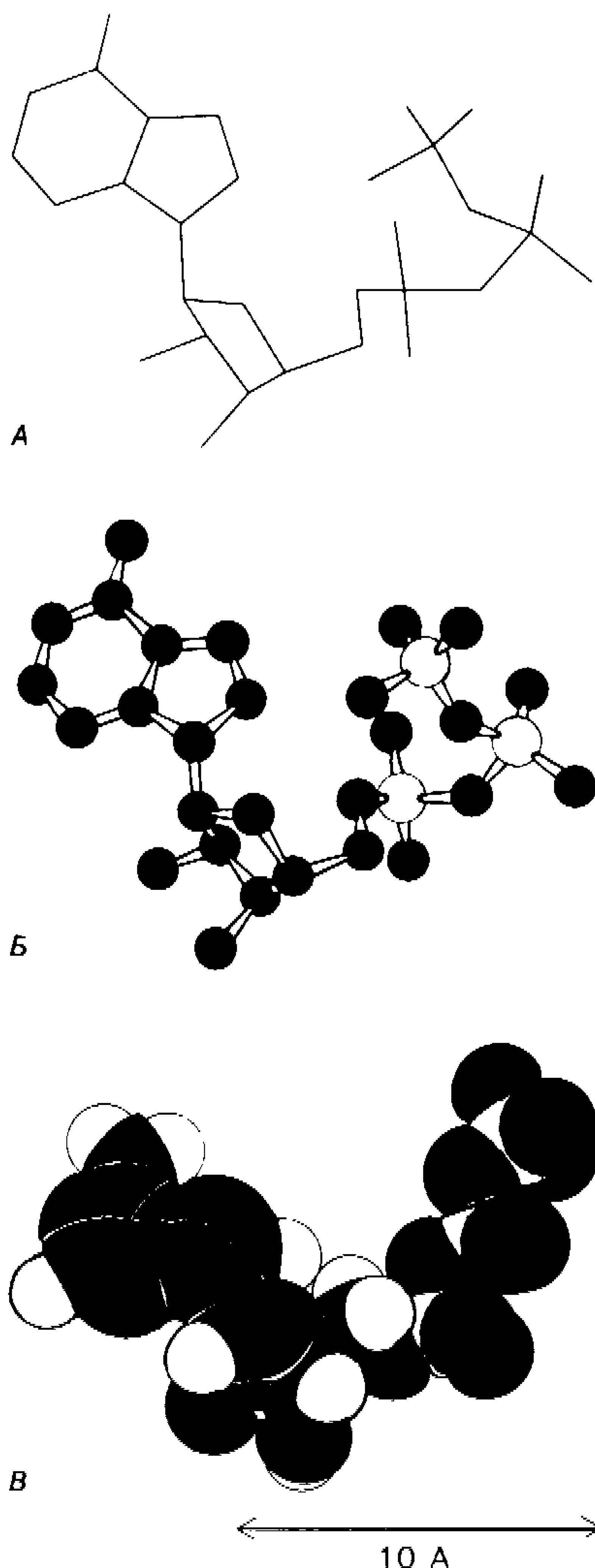


Рис. 1.4. Сравнение различных моделей АТР: *А*–скелетная, *Б*–из шаров и палочек, *В*–пространственная. На моделях *А* и *Б* атомы водорода не показаны.

треть сложную структуру. Еще более простое представление о строении молекул можно получить с помощью *скелетных моделей*, в которых изображается только молекулярная сетка. Сами атомы в скелетных моделях не изображаются, но подразумевается, что они расположены в местах пересечения связей и на их концах. Скелетные модели часто используют для описания сложных биологических макромолекул, например молекул белка, состоящих из нескольких тысяч атомов. Сравнение трех типов моделей АТР–пространственной, из шаров и палочек и скелетной–приведено на рис. 1.4.

1.2. Пространство, время и энергия

При рассмотрении структуры молекул важно представлять себе их размеры (рис. 1.5). Измерения длины на атомарном уровне производят обычно в ангстремах; один ангстрем (Å) равен 10^{-10} метра (м) или 0,1 нанометра (нм). Например, длина связи С—С составляет 1,54 Å. Небольшие биомолекулы, в частности сахара или аминокислоты, как правило, имеют длину в несколько ангстрем. Биологические макромолекулы, например белки, по крайней мере в десять раз крупнее. Так, гемоглобин–белок эритроцитов, переносящий кислород,–имеет диаметр 65 Å. Еще на порядок больше по размеру надмолекулярные комплексы. Например, диаметр рибосом–белок-синтезирующих органелл клетки–составляет около 300 Å. В диапазоне от 100 Å (10 нм) до 1000 Å (100 нм) лежат также размеры большинства вирусов. Клетки же, как правило, имеют в сотни раз большие размеры и измеряются уже в микрометрах (мкм). Например, наибольшая длина эритроцита равна 7 мкм ($7 \cdot 10^4$ Å). Важно отметить, что предел разрешающей способности светового микроскопа составляет около 0,2 мкм (2000 Å), что соответствует размеру многих клеточных органелл. Так, в световом микроскопе видны митохондрии–основные производители АТР в аэробных клетках. Большая часть наших представлений о биологических структурах размерами от 1 Å (0,1 нм) до 10^4 Å (1 мкм) получена благодаря использованию электронной микроскопии и дифракции рентгеновских лучей.

Молекулы, составляющие живое, подвергаются постоянным превращениям. В биологических системах химические реакции катализируются ферментами, которые способны превращать субстрат в продукт реакции за время, исчисляемое, как правило, миллисекундами (мс, 10^{-3} с). Некоторые ферменты работают еще быстрее: реакция завершается за несколько микросекунд (мкс, 10^{-6} с). Конформационные изменения биологических макромолекул протекают также очень быстро. Например, на раскручивание двойной спирали ДНК, необходимое для ее репликации и экспрессии, требуются лишь

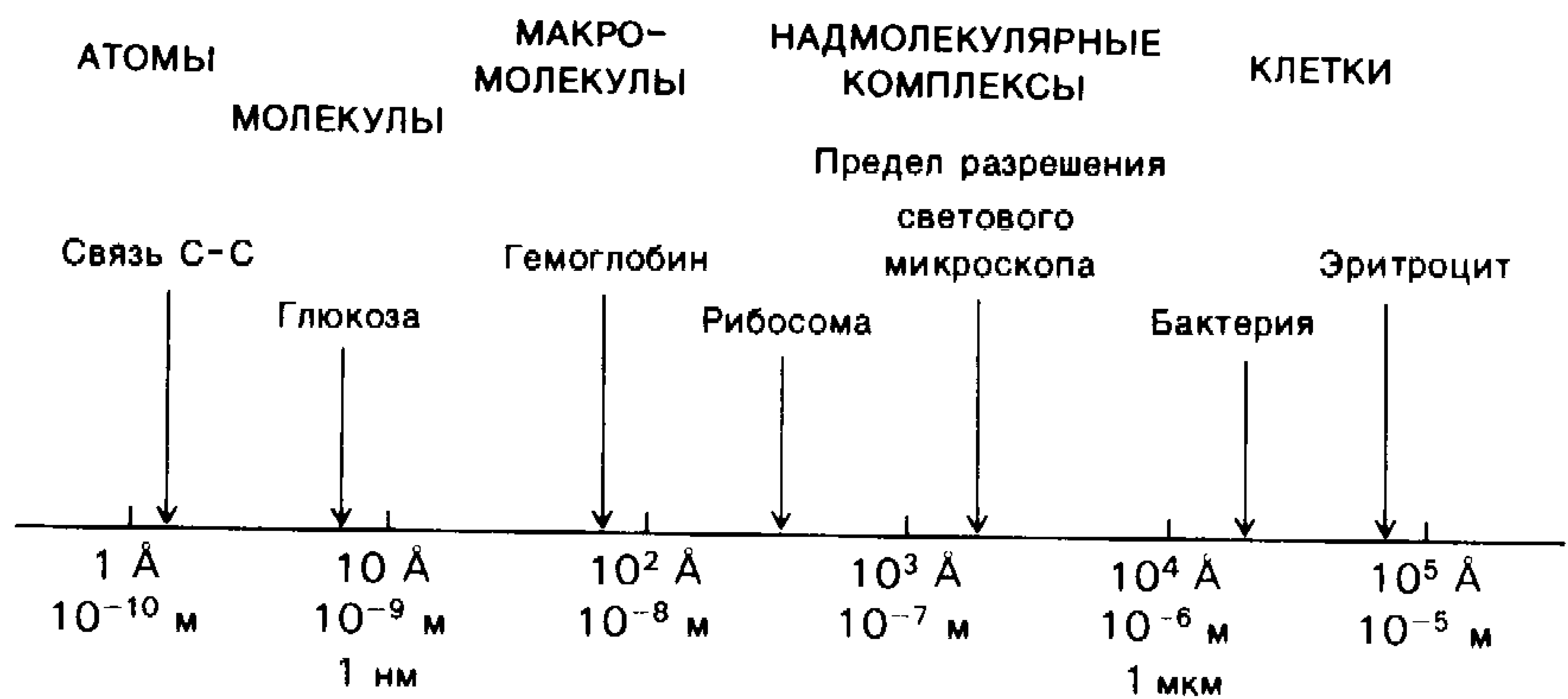


Рис. 1.5. Размеры некоторых биомолекул, надмолекулярных комплексов и клеток.

микросекунды. Поворот одного домена белка по отношению к другому занимает наносекунды (нс, 10^{-9} с). Многие нековалентные связи в макромолекулах образуются и разрываются в течение лишь нескольких наносекунд. Процессы, протекающие еще быстрее, можно оценить лишь с помощью очень коротких световых импульсов лазерных установок. Примечательно, что начальное событие при зрительном восприятии – изменение структуры светопоглощающих группировок - происходит в течение нескольких пикосекунд (пс, 10^{-12} с) после поглощения фотона. Все это показывает, что скорости биологических процессов могут варьировать в широких пределах (рис. 1.6). Весьма важно представлять себе также длительность эволюционного времени. Жизнь на Земле возникла $3{,}5 \cdot 10^9$ лет тому назад, что соответствует $1{,}1 \cdot 10^{17}$ с.

Рассмотрим также изменения энергии, происходящие при различных молекулярных превращениях (рис. 1.7). Первичным источником необходимой для жизни энергии является Солнце. Поглощение видимого света, например фотонов зеленого света, дает 57 килокалорий на моль (ккал/моль). Содержание энергии, запасенной в молекулах АТР – универсальной энергетической валюты в биологических системах,– составляет 12 ккал/моль. По сравнению с этими величинами средняя энергия каждой из степеней свободы колебательного движения молекул невелика: 0,6 ккал/моль при 25°С, что значительно ниже, чем это требуется для диссоциации ковалентных связей (83 ккал/моль для связи С—С, например). Отсюда следует, что образованный ковалентными связями скелет биомолекул стабилен в отсутствие ферментов или притока энергии. С другой стороны, указанная величина тепловой энергии оказывается достаточной для образования или разрыва в биологических системах нековалентных связей, энергия которых составляет обычно лишь несколько килокалорий на моль. Процессы выработки и накопления энергии подробно рассматриваются в части II книги.

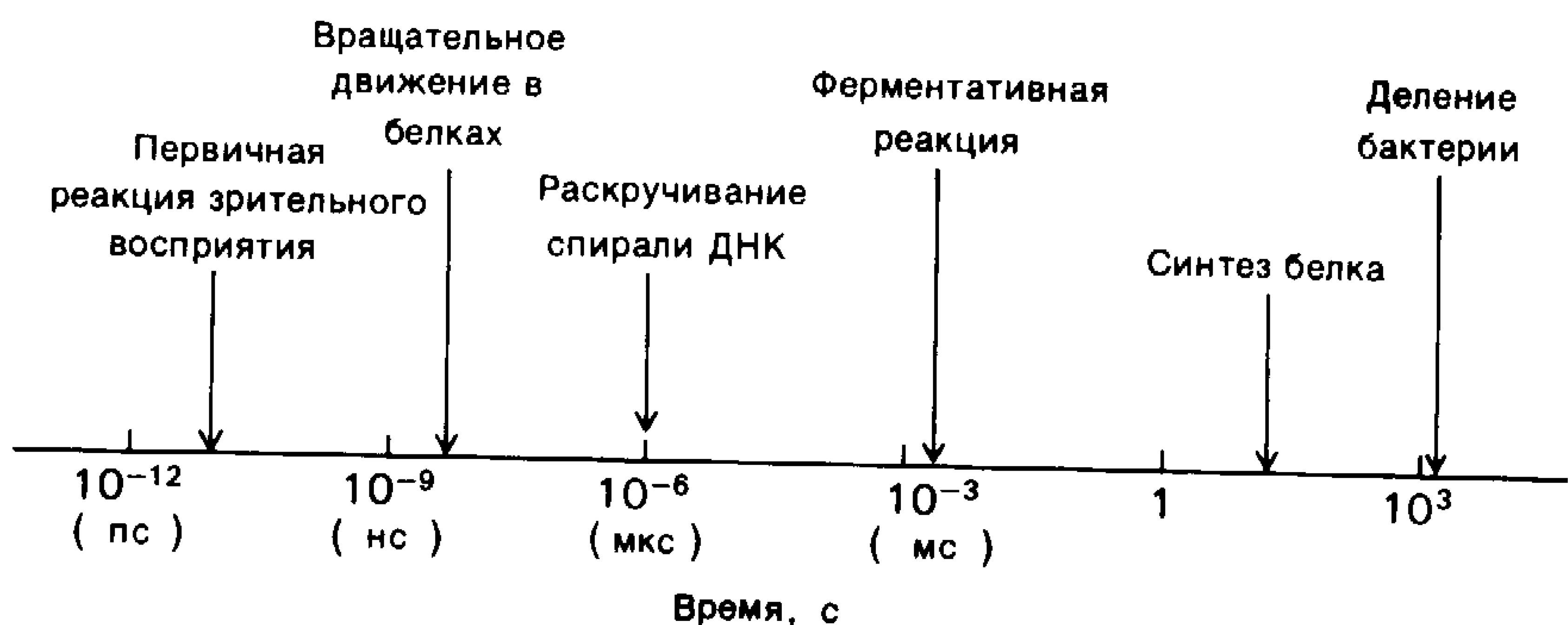


Рис. 1.6. Типичные скорости протекания реакций в биологических системах.

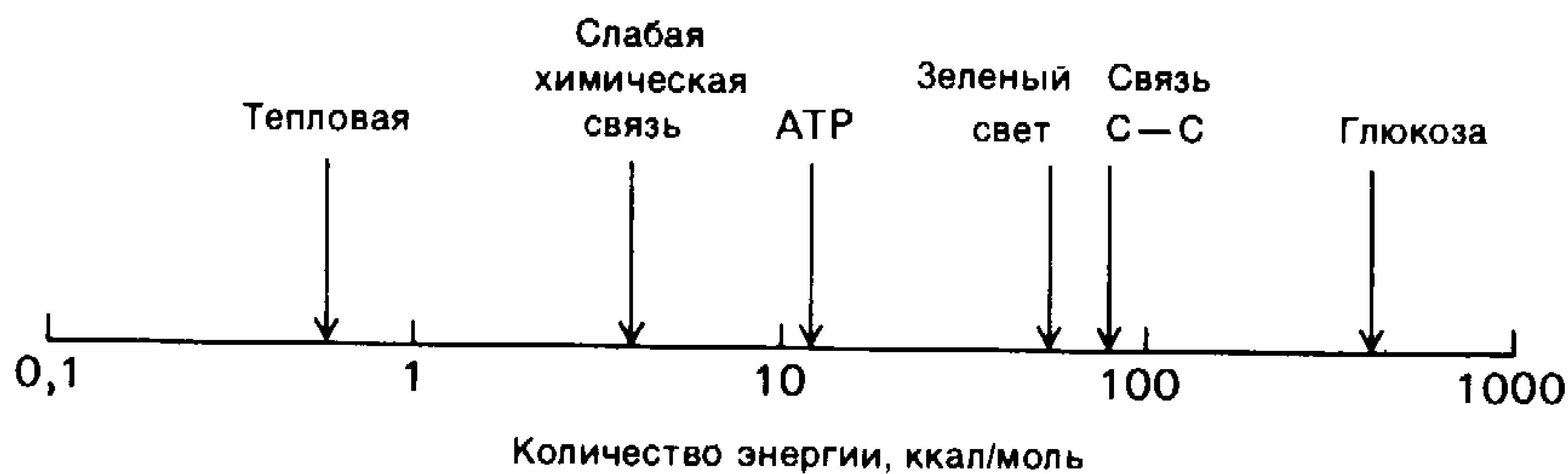


Рис. 1.7. Некоторые биологически важные величины энергии.

1.3. Структура данной книги

Настоящая книга состоит из пяти частей, посвященных следующим основным вопросам.

I. Конформация и динамика.

II. Генерирование и хранение метаболической энергии.

III. Биосинтез предшественников макромолекул.

IV. Генетическая информация.

V. Молекулярная физиология.

Часть I посвящена главным образом описанию взаимосвязи между трехмерной структурой и биологической активностью на примере белков. Подробно рассматриваются структура и функция миоглобина и гемоглобина – белков, транспортирующих кислород у позвоночных, поскольку на этом материале можно проиллюстрировать некоторые общие принципы. Гемоглобин представляет особенно большой интерес в связи с тем, что связывание им кислорода регулируется специфическими веществами окружающей среды. Описывается также молекулярная патология гемоглобина, в частности серповидноклеточная анемия. В разделе, посвященном ферментам, мы познакомимся с тем, каким образом происходит узнавание субстрата ферментом и как фермент может увеличивать скорость реакции в миллион и более раз. Подробно описываются такие ферменты, как лизоцим, карбоксипептидаза А и химотрипсин, при изучении которых были выявлены многие общие принципы катализа. В несколько ином аспекте излагается вопрос о конформации в главе, посвященной двум белкам соединительной ткани – коллагену и эластину. Заключительная глава части I служит введением в проблему биологических мембран, представляющих собой организованные белково-липидные комплексы. Наличие мембран в биологических системах обеспечивает создание в клетке отдельных компартментов (отсеков).

Часть II посвящена вопросам образования и накопления энергии обмена веществ. В первую очередь рассматривается общая стратегия метаболизма. В клетках происходит превращение энергии из «топливных» молекул в ATP. Образующийся ATP в свою

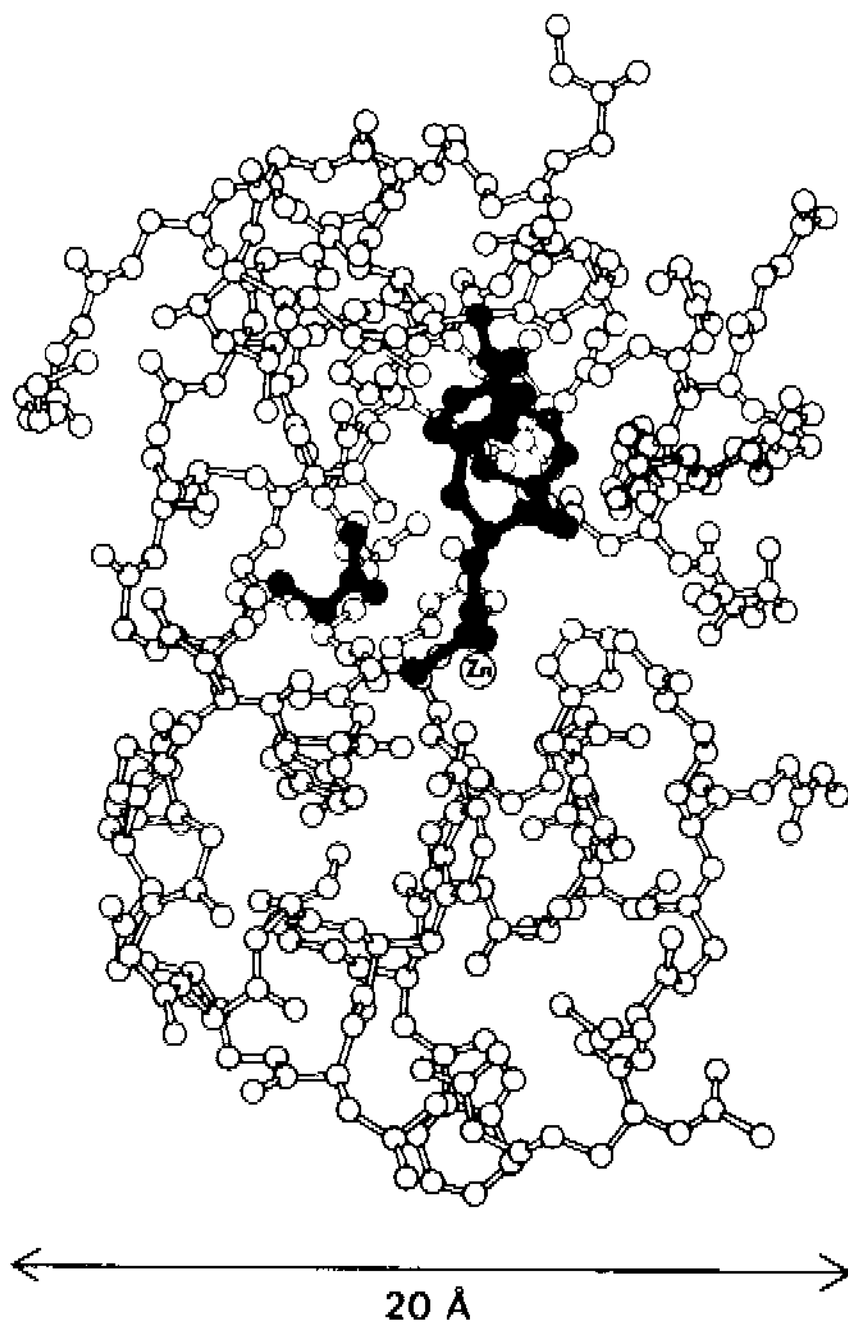


Рис. 1.8. Структура фермент-субстратного комплекса. К карбоксипептидазе А (гидролитический фермент) присоединен глицилтирозин (изображен красным). Показана только одна четверть фермента. [Lipscomb W. H., Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res., 15, 141 (1971)].

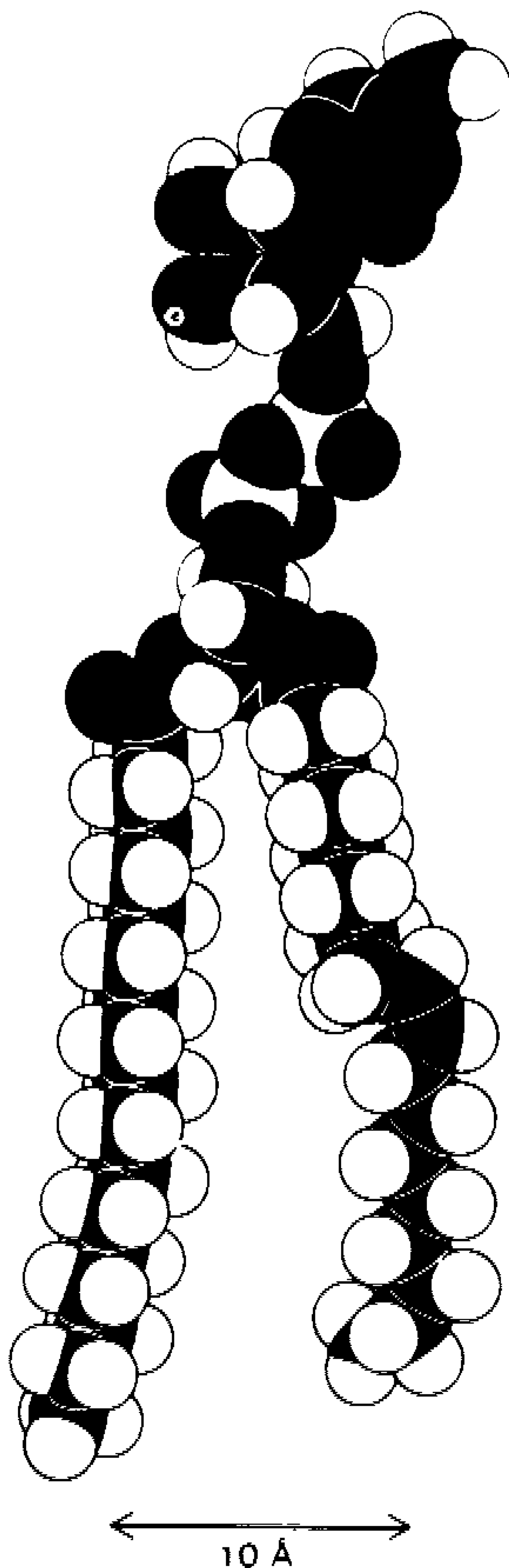


Рис. 1.9. Модель CDP-диацилглицерола – активированного промежуточного продукта в синтезе ряда мембранных липидов.

очередь обеспечивает протекание большинства эндергонических процессов (т.е. процессов, идущих с потреблением энергии). Наряду с ATP в клетках происходит также образование восстановительных эквивалентов в форме никотинамиддинуклеотидфосфата (NADPH), расходуемого в процессах биосинтеза. Пути образования ATP и NADPH описываются подробно. Например, образование ATP при расщеплении глюкозы требует последовательного протекания трех процессов – гликолиза, цикла трикарбоновых кислот (называемого также лимоннокислым циклом, или циклом Кребса) и окислительного фосфорилирования. Последние два процесса участвуют также в образовании ATP при окислении других энергетических ресурсов, а именно жиров и некоторых аминокислот. Этот пример иллюстрирует принцип экономности на молекулярном уровне. В части II рассматриваются также две основные формы накопления энергетических ресурсов в клетках, а именно гликоген и триацилглицеролы (нейтральные . жиры). Заключительная глава этой части книги посвящена фотосинтезу, первичная реакция которого – активированный светом перенос электрона от одного вещества к другому против градиента химического потенциала.

В части III рассматривается биосинтез предшественников макромолекул. Начинается эта часть с описания синтеза мембранных липидов и стероидов. Особый интерес представляет синтез холестерола, C_{27}-стероида, все углеродные атомы которого образуются из двууглеродного предшественника. В следующей главе обсуждаются реакции, ведущие к синтезу ряда аминокислот и гема. Механизмы регуляции этих путей обмена веществ имеют фундаментальное значение. Далее рассматривается биосинтез нуклеотидов – активированных предшественников ДНК и РНК. Заключительная глава посвящена интеграции про-

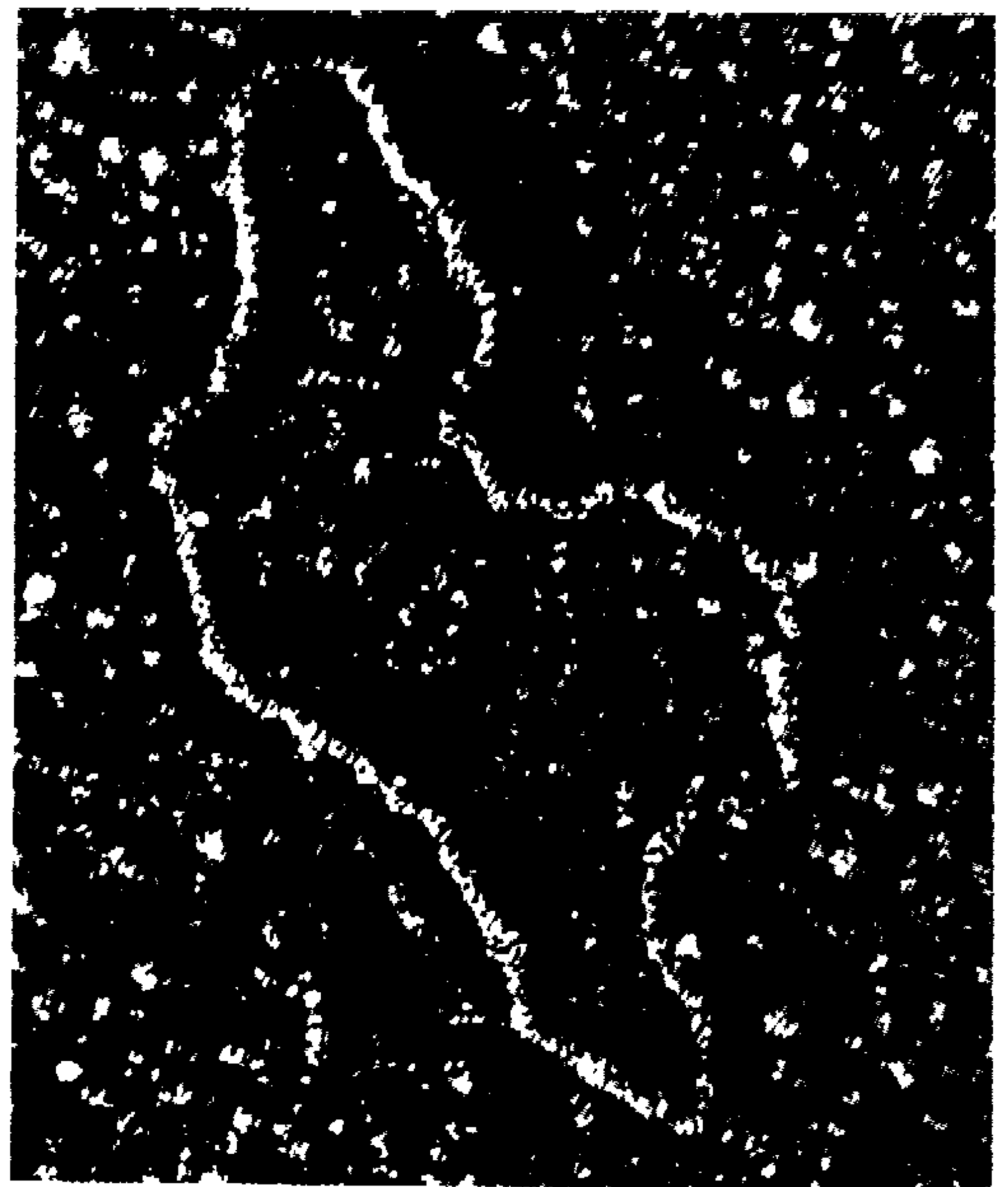


Рис. 1.10. Электронная микрофотография молекулы ДНК. (Печатается с любезного разрешения д-ра T. Broker.)

цессов обмена веществ. Из нее читатель узнает, каким образом реакции, идущие с выделением энергии, и реакции, идущие с ее потреблением, оказываются сбалансированными и обеспечивают нужды организма.

Накопление, передача и экспрессия (выражение в фенотипе) генетической информации составляют основную тему части IV. В начале описываются эксперименты, показывающие, что ДНК является генетическим материалом, а также история открытия двойной спирали ДНК. Затем следует описание ферментативного механизма репликации ДНК. Далее мы перейдем к экспрессии генетической информации, заключенной в ДНК, начав с описания данных о роли информационной РНК как промежуточного переносчика информации. Затем рассматривается процесс транскрипции, т. е. синтез РНК в соответствии с инструкциями, заключенными в матричной ДНК. Из этого логически вытекает описание генетического кода, т.е. взаимосвязи между последовательностью оснований в ДНК (или в транскрибируемой с нее информационной РНК) и последовательностью аминокислот в соответствующем белке. Генетический код, общий для всех живых организмов, прекрасен своей простотой. Три основания составляют кодон – единицу кода, соответствующую одной аминокислоте. Кодоны в информационной РНК последовательно считываются молекулами транспортных РНК, которые выполняют роль адапторов в синтезе белка. Далее мы переходим к механизму белкового синтеза, а именно к процессу трансляции, в ходе которого четырехбуквенный алфавит нуклеиновых кислот, в котором каждая буква представлена соответствующей парой оснований, переводится в 20-буквенный алфавит белков. Трансляция происходит на рибосомах и обеспечивается координированным взаимодействием более чем сотни различных высокомолекулярных соединений. В следующей главе описывается регуляция экспрессии генов у бактерий, причем основное внимание уделяется оперонам лактозы и триптофана у *E. coli*, как наиболее изученным в настоящее время. Далее обсуждаются результаты последних исследований экспрессии генов у более высокоорганизованных организмов (т.е. у эукариот), отличающихся от бактерий (прокариот) более высоким содержанием ДНК и наличием оформленного ядра, что обеспечивает дифференцировку клеток. Затем рассматри-

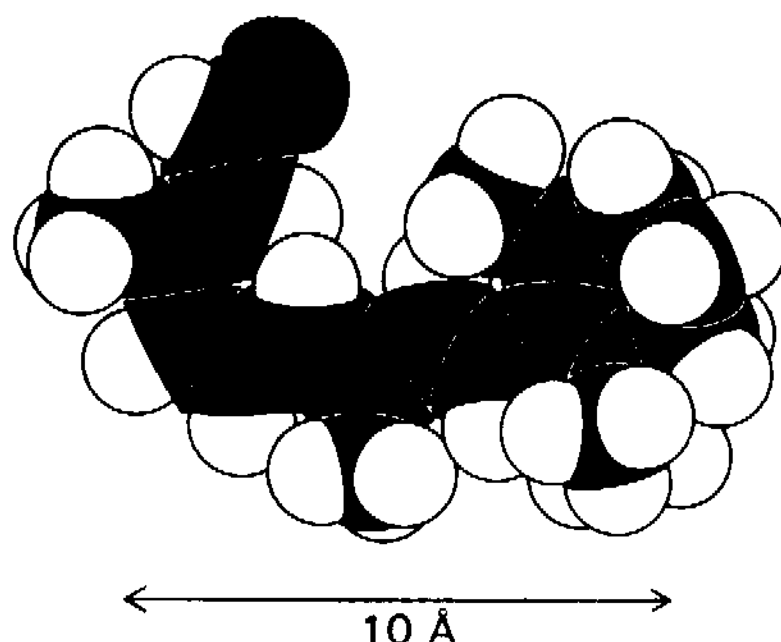


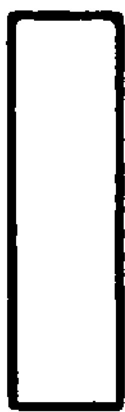
Рис. 1.11. Модель 11-*цис*-ретиналя – светопоглощающей структуры в родопсине. Изомеризация этого хромофора под действием света является первым этапом процесса зрительного восприятия.

ваются размножение вирусов и сборка вирусных частиц. Процесс сборки вирусных частиц иллюстрирует общие принципы образования высокоупорядоченных структур из биологических макромолекул. Особое внимание уделено вирусам, вызывающим раковые опухоли у экспериментальных животных. Заключительная глава части IV посвящена образованию новых генов путем рекомбинации, а также обсуждению вопроса о значении клонирования ДНК.

Часть V, озаглавленная «Молекулярная физиология», представляет собой переход от биохимии к физиологии. При изложении материала здесь используются многие из концепций, сформулированных в предыдущих разделах книги, поскольку физиологии приходится иметь дело с информацией, конформацией и процессами метаболизма в их взаимосвязи. Вначале описывается организация клеточных мембран и оболочек бактериальных клеток и выясняется вопрос, каким образом клетка определяет положение синтезируемых ею белков. Далее следует изложение молекулярных основ иммунного ответа: как организм узнает чужеродные вещества. В следующей главе речь идет о проблеме преобразования энергии химических связей в координированное движение. Как показали исследования последних лет, актин и миозин – основные белки мышц – выполняют функцию сокращения в большинстве клеток высших организмов. Далее описываются молекулярные основы дей-

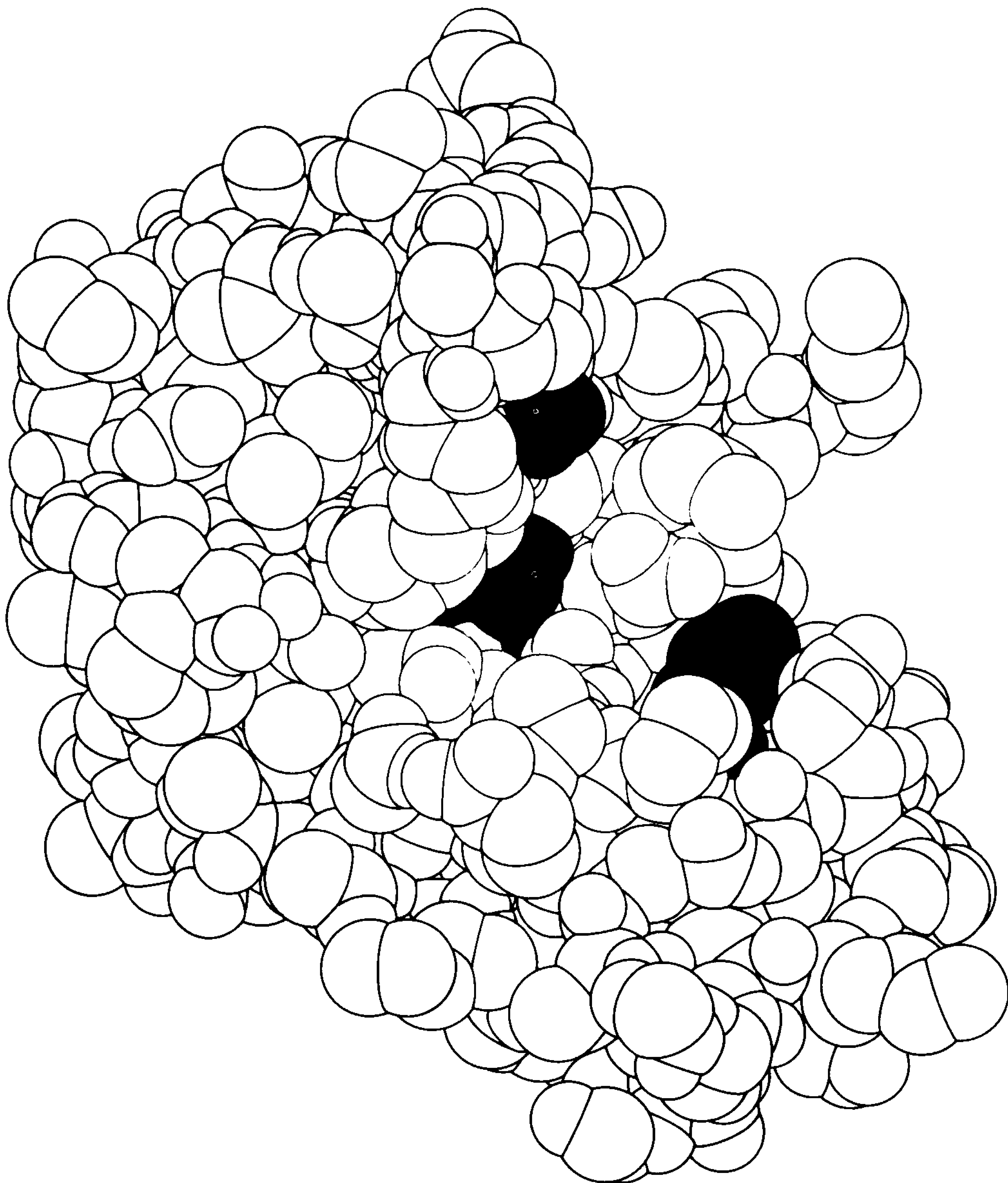
ствия гормонов, причем особое внимание уделяется некоторым общим темам. Затем мы переходим к транспорту молекул и ионов, в частности Na^+, K^+ и Ca^{2+}. Молекулярные ионные насосы, локализованные в мембранах, транспортируют ионы, создавая градиенты их концентрации, лежащие в основе возбудимости. В последней главе, посвященной сенсорным процессам, рассматриваются следующие вопросы: каким образом потенциал действия распространяется по нервным клеткам и проходит через синапс? Как одиночный фотон возбуждает палочку в сетчатке глаза? Каким образом бактерии определяют источник пищи в среде и движутся в направлении к нему?

Одна из наиболее привлекательных особенностей биохимии состоит в том, что эта наука постоянно расширяет наши представления о биологических процессах на всех уровнях организации живого.

Часть 

Конформация и динамика

Рассматривается на примере взаимосвязи между пространственной структурой белков и их биологической активностью



Модель рибонуклеазы S – фермента, гидролизующего рибонуклеиновые кислоты. Цветом выделены аминокислоты в активном центре, критически необходимые для осуществления катализа. Пространственная структура этого фермента была раскрыта Фредериком Ричардсом и Гарольдом Уикофом (по рисунку, любезно предоставленному д-ром F. Richards, S. Anderson и A. Perlo).

ГЛАВА 2.
Основные представления о структуре и функции белков

Белки играют решающую роль практически во всех биологических процессах. Значение и удивительное разнообразие их функций очевидно из следующих примеров.

1. *Ферментативный катализ.* В биологических системах почти все реакции катализируются специфическими макромолекулами, называемыми ферментами. Некоторые из этих реакций, такие как гидратирование диоксида углерода, очень просты. Другие же, например репликация всей хромосомы, в высшей степени сложны. Почти все ферменты – мощные катализаторы, повышающие скорости реакции по крайней мере в миллион раз. Так, в отсутствие ферментов химические превращения in vivo удается выявить очень редко. В настоящее время охарактеризовано несколько тысяч ферментов, причем многие из них выделены в кристаллической форме. Поразителен тот факт, что все известные ферменты являются белками. Следовательно, именно белки определяют ход химических превращений в биологических системах.

2. *Транспорт и накопление.* Транспорт многих небольших молекул и ионов осуществляется специфическими белками. Например, содержащийся в эритроцитах гемоглобин переносит кислород к тканям, тогда как близкий к нему белок миоглобин запасает кислород в мышцах. В плазме крови железо транспортируется в виде комплекса с трансферрином, а в печени оно накапливается в виде комплекса с другим белком – ферритином.

3. *Координированное движение.* Белки – основной компонент мышц. Сокращение мышцы обеспечивается скольжением двух типов белковых нитей относительно друг друга. Координированные движения на микроскопическом уровне, например расхождение хромосом во время митоза или продвижение спермия при помощи жгутика, также обеспечиваются сократительными структурами, состоящими из белков.

4. *Механическая опора.* Высокая упругость кожи и костей обусловлена наличием фибриллярного белка коллагена.

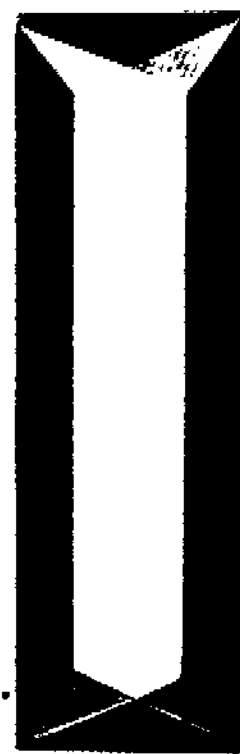


Рис. 2.1. Микрофотография кристалла гексокиназы – ключевого фермента утилизации глюкозы. (Печатается с любезного разрешения д-ра T. Steitz и д-ра M. Yeager.)

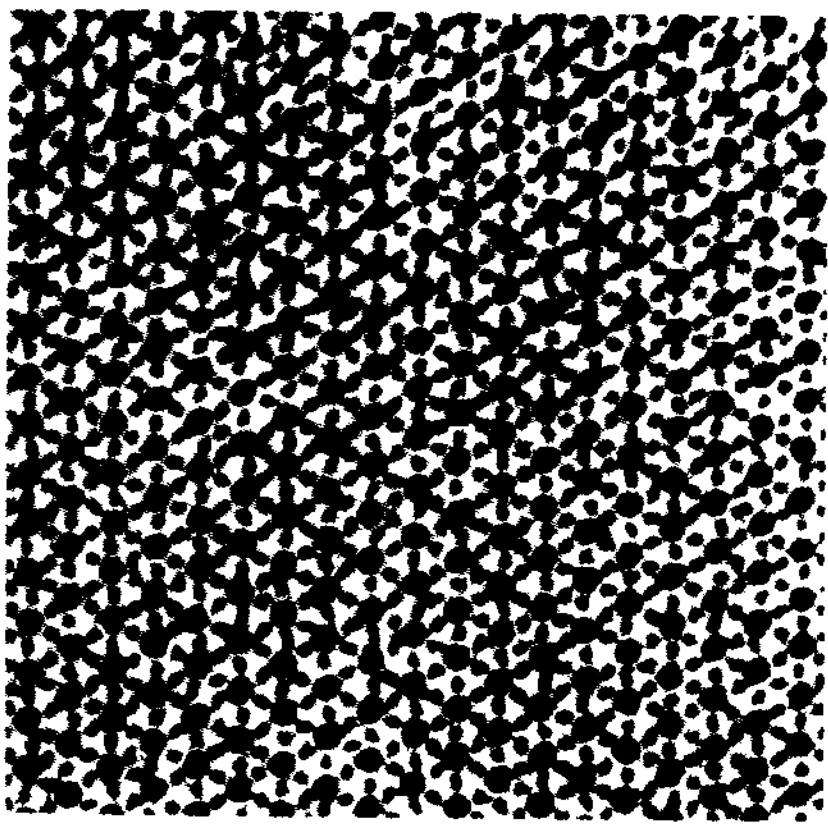


Рис. 2.2. Поперечный срез летательной мышцы насекомого под электронным микроскопом. Видно, что белковые нити двух типов образуют гексагональные структуры. (Печатается с любезного разрешения д-ра M. Reedy.)

5. *Иммунная защита.* Антитела – это высокоспецифические белки, способные узнавать и связывать такие чужеродные объекты, как вирусы, бактерии и клетки других организмов. Таким образом, белки играют жизненно важную роль, различая свое и чужое.

6. *Генерирование и передача нервных импульсов.* Ответ нервных клеток на специфические импульсы опосредован рецепторными белками. Например, родопсин – фоторецепторный белок клеток палочек сетчатки. Молекулы рецепторов, приводимые в действие специфическими веществами небольшой молекулярной массы типа ацетилхолина, обеспечивают передачу нервных импульсов в синапсах, т.е. в местах соединения нервных клеток.

7. *Регуляция роста и дифференцировки.* Строгая регуляция последовательности экспрессии генетической информации имеет крайне важное значение для упорядоченного роста и дифференцировки клеток. В любой отрезок времени жизни организма экспрессируется только небольшая часть генома клетки. У бактерий основным элементом регуляции служат репрессорные белки, которые заставляют «молчать» специфические участки клеточной ДНК. Совершенно другим путем происходит регуляция белками процесса дифференцировки клеток, что видно на примере фактора роста нервов – белкового комплекса, под действием которого формируется сеть нейронов у высших организмов.

2.1. Белки построены из аминокислот

Основной структурной единицей белков являются аминокислоты. Каждая аминокислота состоит из аминогруппы, карбоксильной группы, атома водорода и определенной R-группы, присоединенной к атому углерода, называемому α-углеродом (рис. 2.5). R-группы называют *боковой цепью* по причинам, которые станут очевидными в ходе дальнейшего изложения. При нейтральном значении pH аминокислоты в растворах находятся не в виде неионизированных молекул, а преимущественно в виде *биполярных ионов (цвиттерионов)*. При этом аминогруппа оказывается протонированной ($—NH_3^+$), а карбоксильная группа – диссоциированной ($—COO^-$). Ионизация аминокислоты зависит от значения pH (рис. 2.6). В кислых растворах (например, при pH 1) карбоксильная группа находится в неионизированной форме ($—COOH$), а аминогруппа ионизирована ($—NH_3^+$). В щелочных растворах (например, при pH 11), наоборот, ионизирована карбоксильная группа ($—COO^-$), а аминогруппа не ионизи-

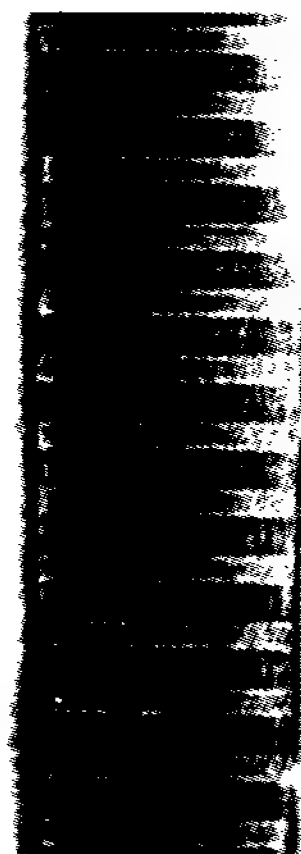


Рис. 2.3. Электронная микрофотография коллагенового волокна. (Печатается с любезного разрешения д-ра J. Cross и д-ра R. Bruns.)



Рис. 2.4. Микрофотография ганглия. Видна пролиферация нервов после добавления фактора роста нервов, представляющего собой комплекс белков. (Печатается с любезного разрешения д-ра E. Shooter.)

рована ($-NH_2$). Представления о роли pH и кислотно-щелочных свойствах аминокислот дополнительно обсуждаются в приложении к этой главе.

Расположение в виде тетраэдра четырех разных химических групп вокруг α-углеродного атома обусловливает оптические свойства аминокислот. Структуры, представляющие собой зеркальное отражение друг друга, называются L- и D-изомерами (рис. 2.7). *В состав белков входят только L-аминокислоты.* Поэтому в последующем изложении мы будем опускать обозначение изомера, имея в виду, что в тех случаях, когда речь идет о структуре белков, подразумеваются L-аминокислоты (за исключением специально оговоренных случаев).

В белках встречается 20 видов боковых аминокислотных цепей, различающихся по *размерам, форме, способности образовывать водородные связи и химической реакционноспособности.* Подчеркнем, что все белки всех видов живых существ – от бактерии до человека – построены из одного и того же набора 20 аминокислот. Этот универсальный белковый алфавит существует уже около 2 млрд. лет. Тот факт, что белки способны выполнять различные функции, обусловлен разнообразием и гибкостью свойств составляющих их 20 структурных элементов. В последующих главах мы увидим, как на основе этого алфавита возникают сложнейшие трехмерные структуры, благодаря которым белки способны участвовать в столь большом числе биологических процессов.

Рассмотрим этот набор аминокислот. Простейший в их ряду – глицин, у которого на месте боковой цепи находится атом водорода (рис. 2.8). У аланина боковая цепь представлена метильной группой. Валин, лейцин, изолейцин и пролин содержат углеводородные боковые цепи. Пролин, однако, отличается от других 19 аминокислот основного набора тем, что имеет вторичную, а не первичную аминогруппу (рис. 2.9). Строго говоря, пролин является имино- (а не амино-) кислотой. Боковая цепь в проли-



Рис. 2.5. Структура аминокислоты в неионизированной форме и в форме цвиттериона.

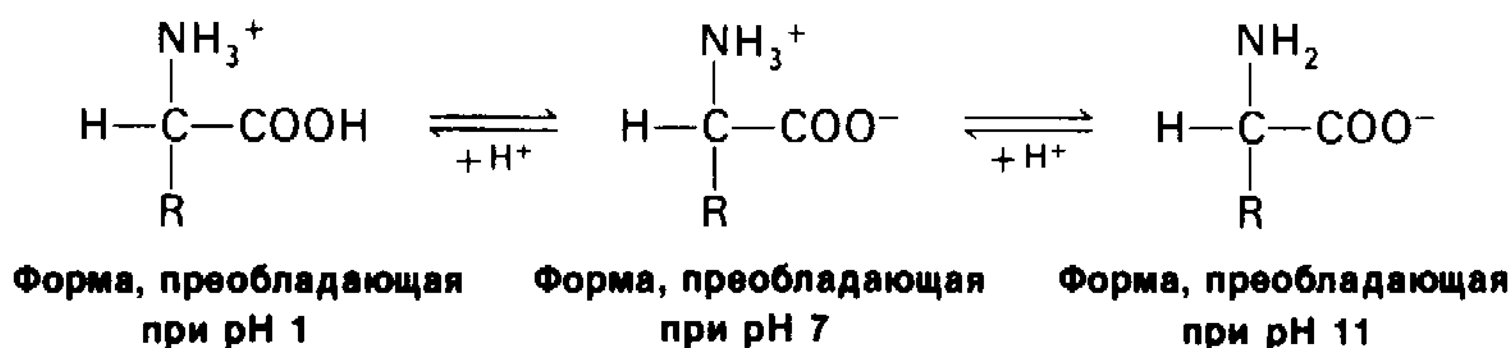


Рис. 2.6. Зависимость ионизации аминокислоты от значения pH.

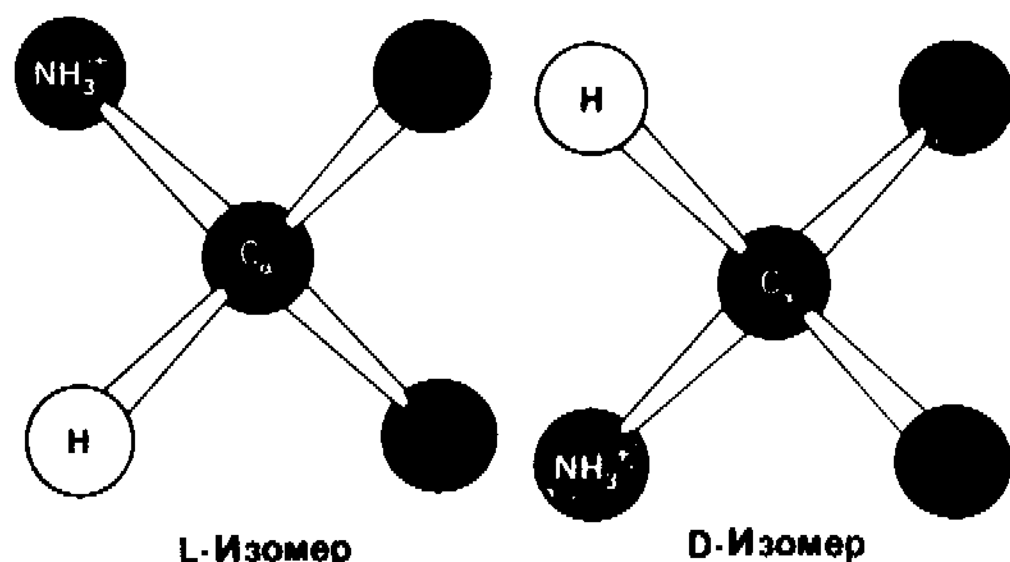


Рис. 2.7. Абсолютные конфигурации L- и D-изомеров аминокислот.

Имеются три широко распространенные ароматические аминокислоты: фенилаланин, тирозин и триптофан (рис. 2.11).

У всех вышеперечисленных аминокислот боковые цепи не несут заряда при физиологических значениях pH. Обратимся теперь к аминокислотам с заряженными боковыми цепями. При нейтральном значении pH лизин и аргинин несут положительный заряд, а гистидин – либо заряжен положительно, либо нейтрален в зависимости от микроокружения. Эти основные аминокислоты показаны на рис. 2.12. Боковые цепи глутаминовой и аспарагиновой кислот (рис. 2.13). несут отрицательный заряд. Далее мы будем называть эти аминокислоты соответственно глутамат и аспартат, подчеркивая

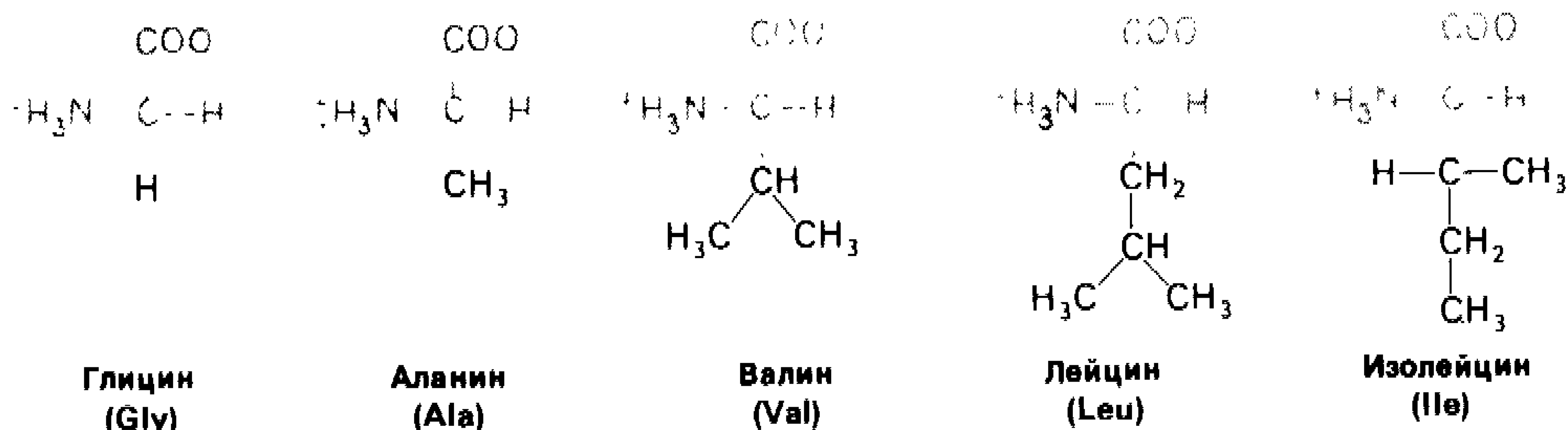


Рис. 2.8. Аминокислоты с алифатическими боковыми цепями.

тот факт, что при физиологических значениях pH они несут отрицательный заряд. Существуют незаряженные производные глутамата и аспартата – глутамин и аспарагин (рис. 2.14), которые вместо концевой карбоксильной группы содержат амидную группу. Наконец, у двух аминокислот в боковой цепи находится атом серы. Это метионин и цистеин (рис. 2.15). Как будет показано далее, цистеин во многих белках играет особую роль, обеспечивая образование поперечных дисульфидных связей.

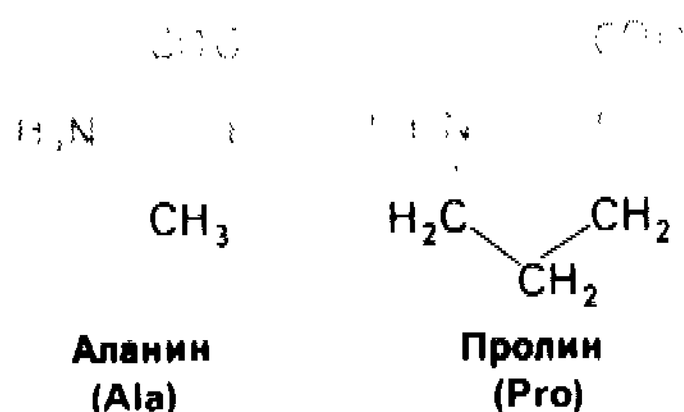


Рис. 2.9. Пролин отличается от других обычных аминокислот наличием вторичной аминогруппы.

не присоединена как к аминогруппе, так и к α-углероду, и в результате получается циклическая структура.

Две аминокислоты – серин и треонин – содержат алифатические гидроксильные группы (рис. 2.10).

2.2. Особые аминокислоты дополняют основной набор, насчитывающий двадцать аминокислот

В ряде белков содержатся особые аминокислоты, образующиеся путем модификации обычных аминокислот после их включения

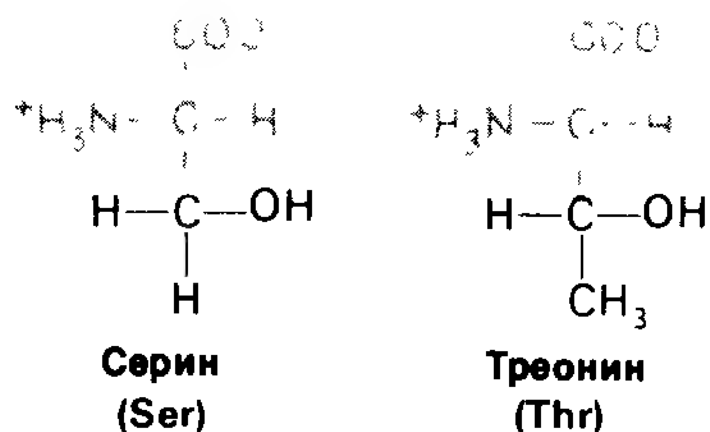


Рис. 2.10. У серина и треонина боковая цепь представлена алифатической гидроксильной группой.

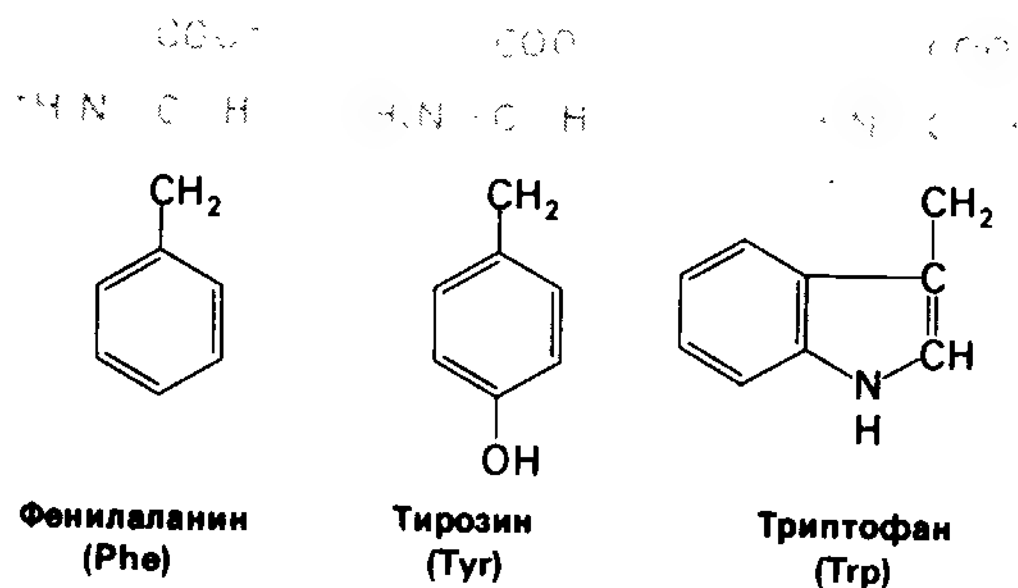


Рис. 2.11. Фенилаланин, тирозин и триптофан имеют ароматические боковые цепи.

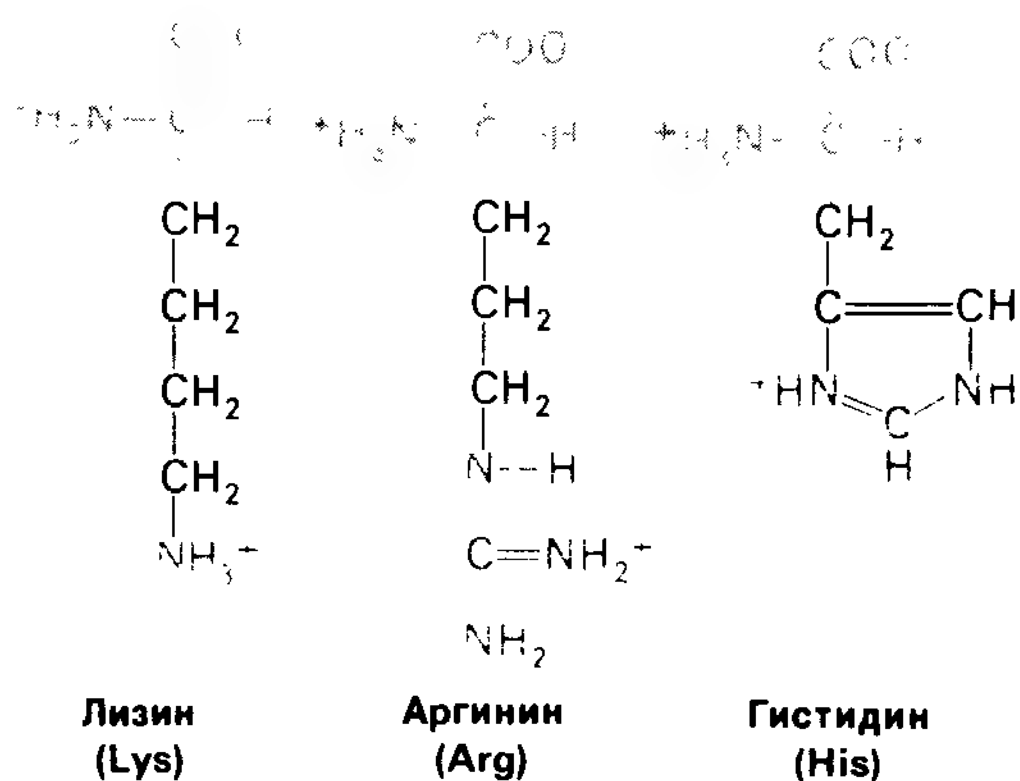


Рис. 2.12. Лизин, аргинин и гистидин имеют основные боковые цепи.

в полипептидную цепь. Так, например в состав коллагена входит гидроксипролин – гидроксилированное производное пролина (рис. 2.16). Как будет показано далее (разд. 9.7), дополнительная гидроксильная группа стабилизирует структуру коллагенового волокна. Биологическое значение этой модификации аминокислоты становится очевидным при цинге, развивающейся в результате недостаточного гидроксилирования коллагена. Еще одна модифицированная кислота – γ-карбоксиглутамат. Нарушение карбоксилирования глутамата в протромбине – белке свертывающей системы крови – может привести к кровоточивости (разд. 8.23). Из обнаруженных в белках модифицированных аминокислот чаще всего встречается фосфосерин. Действие ряда гормонов опосредуется процессами фосфорилирования или дефосфорилирования специфических остатков серина в различных белках (разд. 16.11).

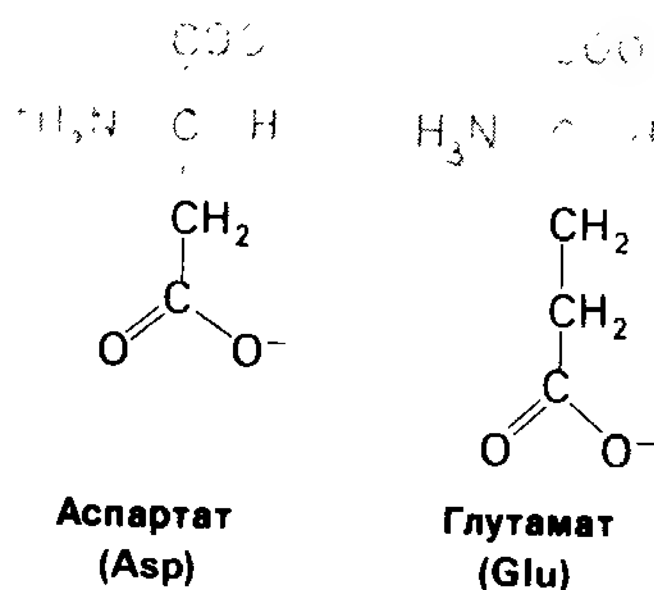


Рис. 2.13. Аспартат и глутамат имеют кислотные боковые цепи.

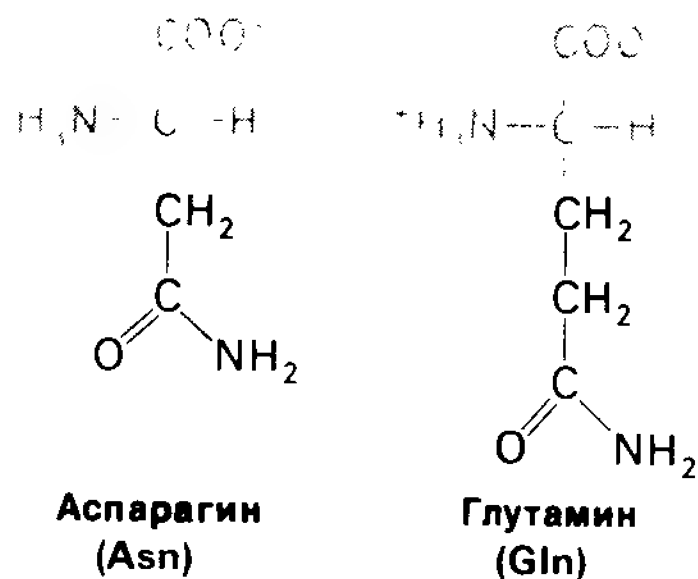


Рис. 2.14. Аспарагин и глутамин имеют амидные боковые цепи.

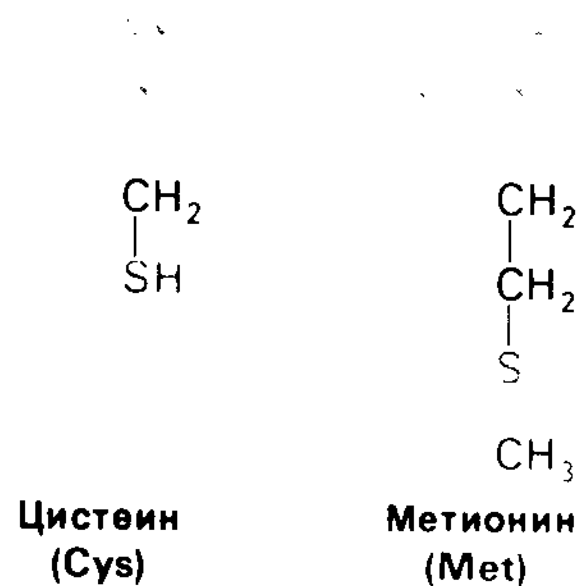


Рис. 2.15. Цистеин и метионин имеют серусодержащие боковые цепи.

Таблица 2.1. **Сокращенные обозначения аминокислот**

Аминокислота	Трехбуквенное сокращение	Однобуквенное обозначение
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагин или аспарагиновая кислота	Asx	B
Аспарагиновая кислота	Asp	D
Валин	Val	V
Гистидин	His	H
Глицин	Gly	G
Глутамин	Gln	Q
Глутамин или глутаминовая кислота	Glx	Z
Глутаминовая кислота	Glu	E
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Y
Фенилаланин	Phe	F
Цистеин	Cys	C

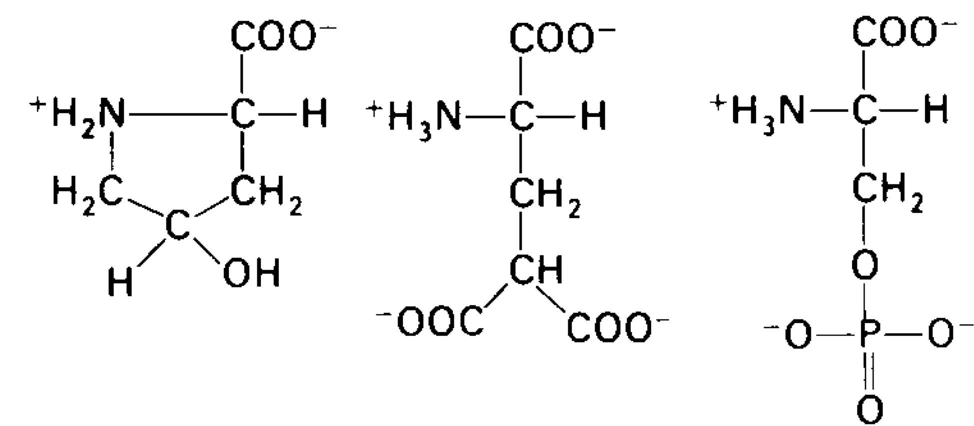


Рис. 2.16. Ряд модифицированных аминокислотных остатков, содержащихся в белках: гидроксипролин, γ-карбоксиглутамат и фосфосерин. Красным показаны группы, которые присоединяются к аминокислотному остатку после его включения в полипептидную цепь.

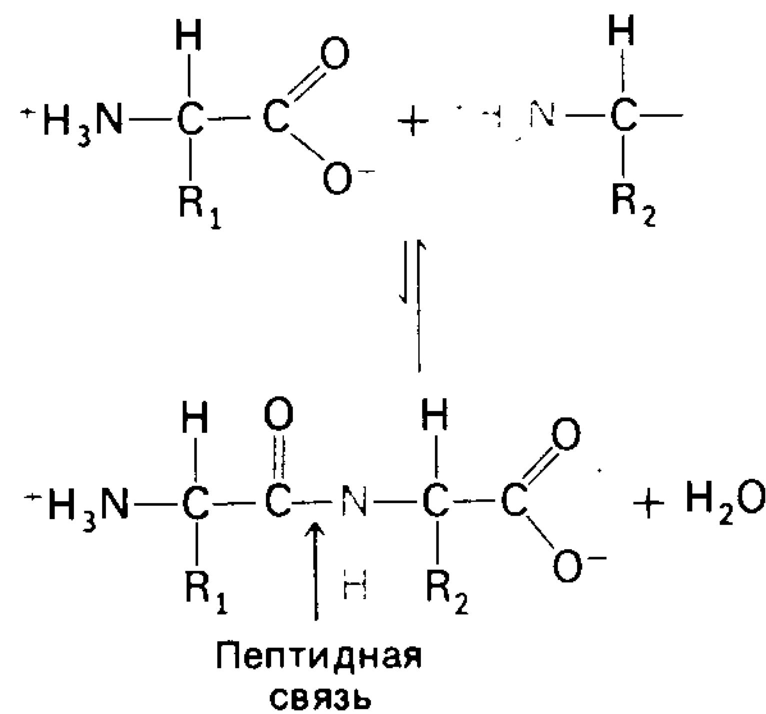


Рис. 2.17. Образование пептидной связи.

2.3. Аминокислоты, соединяясь пептидной связью, образуют полипептидные цепи

В белках α-карбоксильная группа одной аминокислоты соединена с α-аминогруппой другой аминокислоты *пептидной связью* (называемой также амидной связью). На рис. 2.17 показано, как из двух аминокислот образуется дипептид с высвобождением одной молекулы воды. Равновесие этой реакции сильно сдвинуто в сторону гидролиза, а не синтеза. Следовательно, биосинтез пептидных связей требует притока свободной энергии, тогда как гидролиз идет с высвобождением энергии.

При соединении большого числа (обычно более сотни) аминокислот путем образования пептидных связей формируется *полипептидная цепь*, имеющая неразветвленную структуру (рис. 2.18). Каждую аминокислоту, входящую в состав полипептида, называют *аминокислотным остатком*. Полипептидная цепь имеет определенное направление, поскольку каждый из ее строительных блоков имеет разные концы – либо α-амино-, либо α-карбоксильная группа. Условились считать, что *полипептидная цепь начинается с N-конца, т.е. с конца, несущего аминогруппу*. При изображении последовательности аминокислот в полипептидной цепи начинают с N-концевого остатка. Так, в трипептиде аланин-глицин-триптофан аланин несет концевую аминогруппу, а триптофан – концевую карбоксильную группу. Обратите внимание, что триптофан-глицин-аланин – это уже другой трипептид.

Полипептидная цепь состоит из регулярно повторяющихся участков, образующих *основную цепь*, и вариабельной части, включающей в себя характерные *боковые цепи* (рис. 2.19). Основную цепь называют иногда скелетом, или остовом, молекулы.

В ряде белков отдельные боковые цепи соединены между собой *дисульфидными связями* (мостиками), которые образуются при окислении остатков цистеина. Возникаю-

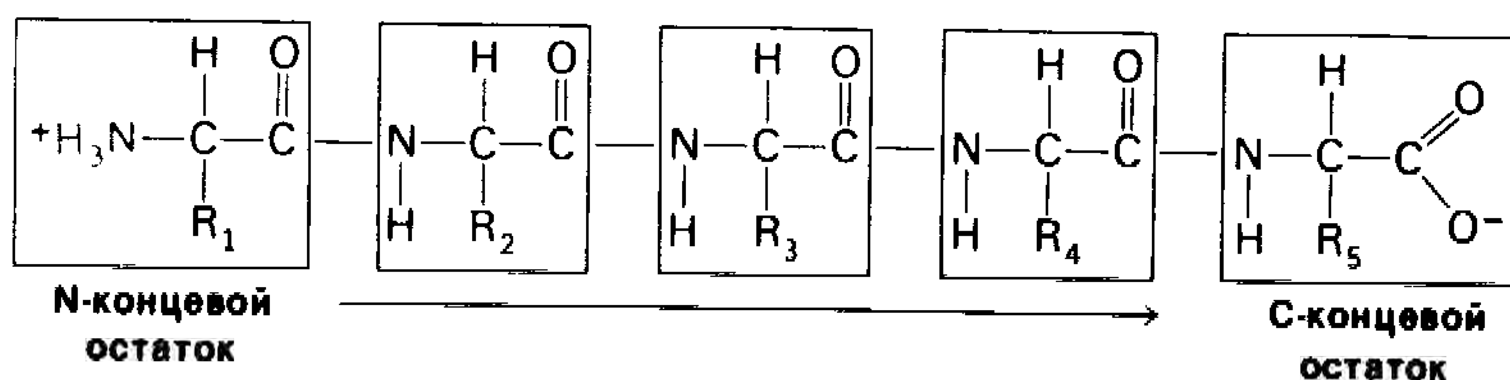


Рис. 2.18. Пентапептид. Каждый аминокислотный остаток выделен рамкой. Пептидная цепь начинается с аминоконца.

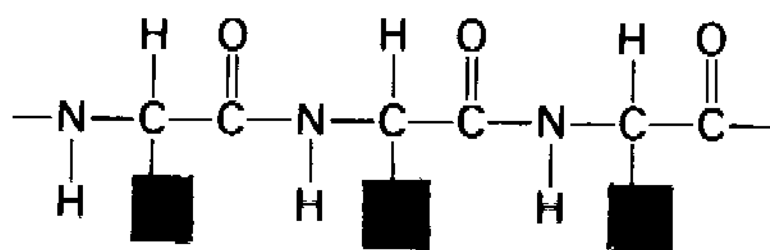


Рис. 2.19. Полипептидная цепь состоит из *скелета*, имеющего регулярную, повторяющуюся структуру, и отдельных *боковых цепей* (R_1, R_2, R_3; показаны зеленым).

молекулы, растворимость, заряд, специфическое сродство связывания. Обычно применяют несколько разных методов очистки и сравнивают их эффективность путем определения интересующего белка по какому-то свойству. Например, ферменты определяют по удельной каталитической активности. При этом измеряют также и общее количество белка, что позволяет установить сте-

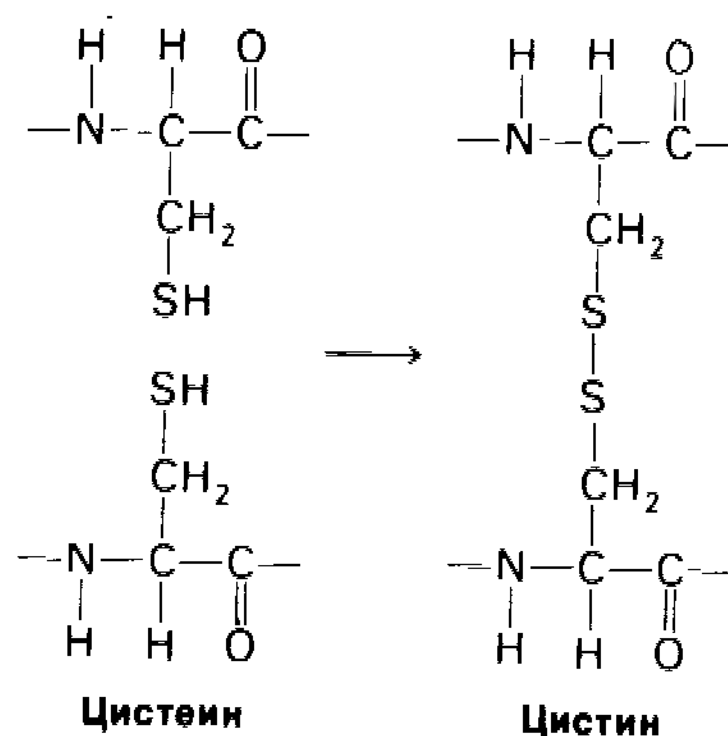


Рис. 2.20. Дисульфидный мостик (—S—S—) образуется из сульфгидрильных групп (—SH) двух остатков цистеина. Продуктом реакции является остаток *цистина.*

щий при этом дисульфид называется цистином (рис. 2.20). Каких-либо других ковалентных связей в белках обычно не встречается.

2.4. Белки состоят из одной или нескольких полипептидных цепей

Многие белки, в частности миоглобин, состоят из одной полипептидной цепи; другие содержат две цепи или более, причем цепи могут быть одинаковыми или разными. Так, молекула гемоглобина построена из 2 цепей одного типа и 2 цепей другого типа; эти четыре цепи связаны между собой нековалентными связями. В некоторых многоцепочечных белках полипептидные цепи соединены дисульфидными мостиками. В инсулине, например, две составляющие его цепи соединены двумя дисульфидными связями.

2.5. Для очистки белков можно использовать множество различных методов

Для выяснения механизма действия белка его необходимо выделить в очищенном виде. В настоящее время в чистом виде получено уже несколько тысяч белков. В процессе выделения и очистки белок отделяют от других белков и от небелковых соединений, исходя из таких его свойств, как *размер*

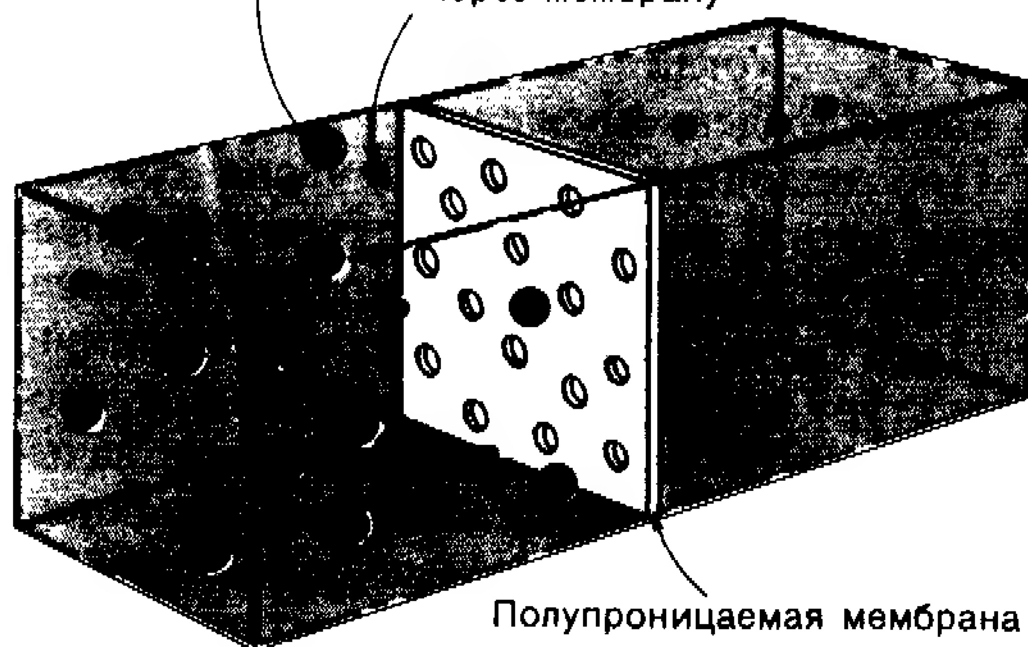


Рис. 2.21. Разделение молекул по размеру путем диализа.

пень очистки данного белка на каждом этапе выделения.

Отделение белков от низкомолекулярных веществ проводят путем диализа через полупроницаемую мембрану (рис. 2.21). Белки, молекулярная масса которых превышает 15 килодальтон (кДа) остаются внутри обычного диализного мешочка, тогда как более мелкие молекулы и ионы проходят через поры диализной мембраны и выходят из мешочка в диализат.

Дальтон (Да) –
: единица массы, практически равная массе атома водорода (т. е. 1,0000 по шкале атомных масс). Терминами «дальтон» и «молекулярная масса» пользуются как взаимозаменяемыми; например, белок в 20 000 дальтон имеет молекулярную массу 20 000. Наименование дано в честь Джона Дальтона (1766–1844), разработавшего атомарную теорию строения материи.

Килодальтон (кДа) –
: единица массы, равная 1000 дальтон. Масса большинства белков лежит в пределах от 10 до 100 кдал.

Разделение белков по размеру молекулы проводят также методом *гель-фильтрации* (рис. 2.22). В этом случае пробу наносят на колонку из нерастворимого, но высокогидратированного углеводного полимера, состоящего из мелких частиц в виде зерен диаметром обычно 0,1 мм. Обычно используют имеющийся в продаже сефадекс. Небольшие молекулы проникают внутрь частиц полимера, а крупные – нет. В результате низкомолекулярные вещества оказываются в водном растворе как внутри частиц, так и между ними, тогда как высокомолекулярные – в водном растворе только между частицами. Вследствие этого высокомолекулярные вещества, оказавшись в относительно меньшем объеме, быстрее проходят сквозь колонку и первыми снимаются с нее.

Разделение белков на основе различий в общем заряде осуществляется методом *ионообменной хроматографии*. Если белок имеет положительный заряд при pH 7, то он обычно связывается на колонке ионообменника, содержащего карбоксильные группы, тогда как отрицательно заряженный белок таким ионообменником не связывается. Такой положительно заряженный белок снимают с колонки путем добавления в элюирующий буфер хлористого натрия или какой-либо другой соли. При этом ионы натрия конкурируют с положительно заряженными группами белков за места связывания на колонке. Те белки, у которых плотность положительного заряда ниже, вымываются с колонки первыми, за ними следуют белки с более высокой плотностью положительного заряда. Помимо общего заряда на поведение белков при ионообменной хроматографии оказывают влияние и другие факторы. Общий заряд белка определяет также и скорость его миграции в электрическом поле. На этом принципе основан метод *электрофореза*, который мы подробнее обсудим в одной из следующих глав (разд. 5.3). Здесь же стоит отметить высокую разрешающую способность метода электрофореза. Так, используя двумерный электрофорез, удалось получить более 1000 различных фракций при однократном разделении белков такого простого организма, как бактерия *E.coli* (рис. 2.23).

Еще один мощный и универсальный способ очистки белков – *хроматография по сродству (аффинная хроматография)*. В основе метода лежит характерное для многих белков высокое сродство к специфическим химическим группам. В частности, расти-

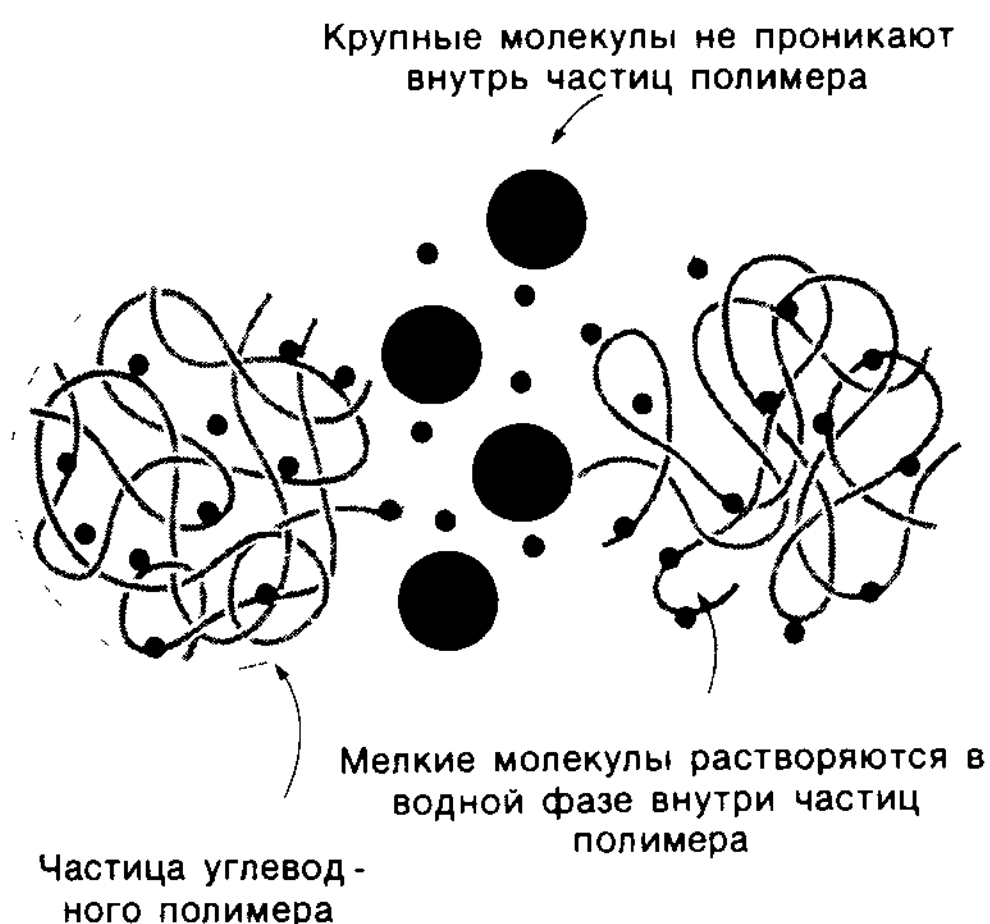


Рис. 2.22. Разделение молекул по размеру методом гель-фильтрации.



Рис. 2.23. Двумерный электрофорез белков *E. coli*. Метод позволяет выявить более 1000 различных белков этой бактерии. Разделение происходит на основе различий в изоэлектрической точке белков (электрофорез в горизонтальном направлении) и на основе различий в молекулярной массе (вертикальный электрофорез). (Печатается с любезного разрешения д-ра P. H. O'Farrell.)

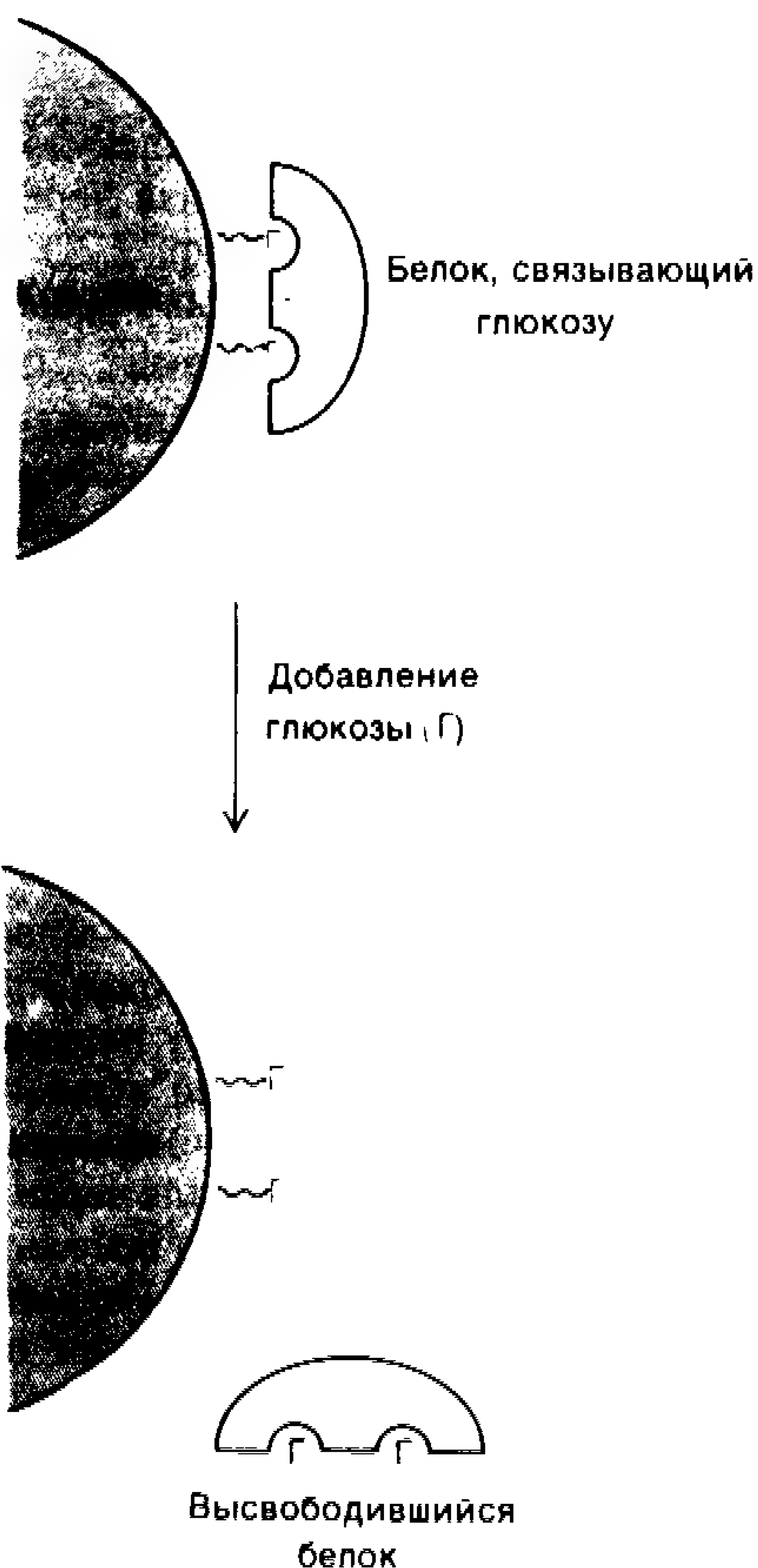


Рис. 2.24. Хроматография по сродству (аффинная хроматография) конканавалина А (показан желтым) на колонке, содержащей ковалентно присоединенные остатки глюкозы (Г).

тельный белок конканавалин А можно выделить из неочищенного экстракта, пропуская экстракт через колонку, содержащую ковалентно присоединенную глюкозу. Конканавалин А, обладающий сродством к глюкозе, связывается с колонкой, тогда как остальные белки, как правило, на колонке не адсорбируются. Далее связанный конканавалин А снимают с колонки концентрированным раствором глюкозы. При этом в участках связывания глюкозы в молекулах конканавалина А происходит замещение присоединенных к колонке остатков глюкозы на глюкозу, находящуюся в растворе (рис. 2.24). Итак, с помощью хроматографии по сродству можно выделять белки, которые распознают какую-то группу X; для этого: 1) X или ее производное ковалентно присоединяют к колонке; 2) наносят на колонку белковую смесь и затем не связавшиеся белки удаляют буфером; 3) элюируют искомый белок, добавляя X в виде раствора высокой концентрации.

2.6. Последовательность аминокислот в белках уникальна и детерминируется генами

В 1953 г. Фредерик Сэнгер (Sanger) определил последовательность аминокислот в белковом гормоне – инсулине (рис. 2.25). *Эта работа представляет собой веху в развитии биохимии, ибо в ней впервые было показано, что белок имеет строго определенную последовательность аминокислот.* Кроме того, это достижение послужило стимулом для других исследователей подвергнуть аналогичному анализу большое множество белков. И действительно, к настоящему времени установлена полная последовательность аминокислот у нескольких сотен белков. Самое поразительное, что каждый белок имеет уникальную, точно определенную последовательность аминокислот. В серии остроумных работ, проведенных в конце

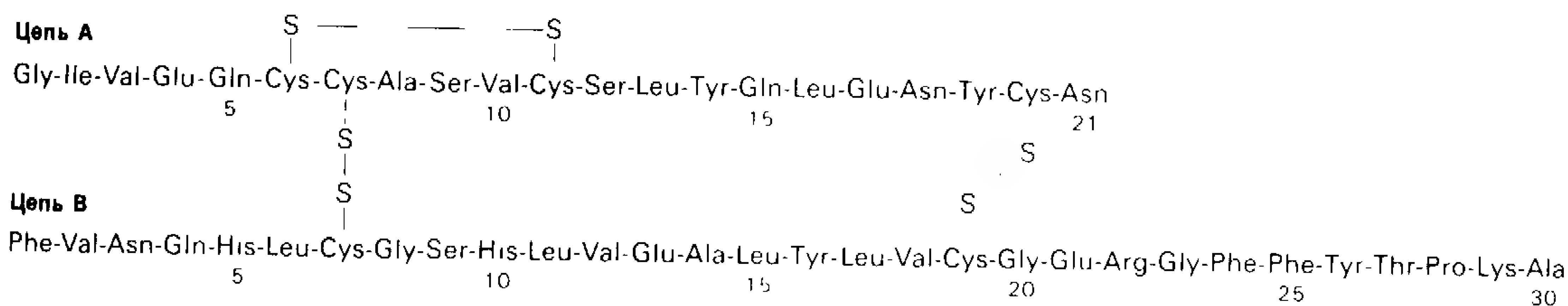


Рис. 2.25. Последовательность аминокислот в инсулине крупного рогатого скота.

50-х – начале 60-х годов было обнаружено, что последовательность аминокислот в белках детерминирована генетически. Последовательность нуклеотидов в ДНК – веществе наследственности – определяет комплементарную последовательность нуклеотидов в РНК, а последняя в свою очередь определяет последовательность аминокислот в белке (гл. 25). Более того, синтез всех белков из соответствующих аминокислот имеет единый механизм.

Определение последовательности аминокислот в белках представляет интерес по четырем причинам. Во-первых, такие данные имеют большое значение для выяснения молекулярной основы биологической активности белка. Сведения о последовательности аминокислот приобретают особую ценность при их сопоставлении с другими химическими и физическими характеристиками. Во-вторых, изучение последовательности аминокислот в сочетании с детальным анализом пространственной структуры необходимо для выяснения тех принципов, на основе которых из полипептидных цепей формируются высокоспецифичные трехмерные формы. При этом последовательность аминокислот в белке служит связующим звеном между генетической информацией, заложенной в ДНК, и трехмерной структурой белка, лежащей в основе его биологической активности. В-третьих, изменения в последовательности аминокислот могут привести к нарушению нормальной функции белка, а следовательно, и к соответствующей болезни. В частности, такая тяжелая болезнь, как серповидноклеточная анемия, нередко приводящая к летальному исходу, возникает в результате замены всего лишь одной-единственной аминокислоты в одном-единственном белке. Таким образом, определение последовательности аминокислот относится к новой области медицины – молекулярной патологии. В-четвертых, данные о последовательности аминокислот в белке могут многое рассказать о его эволюции. Дело в том, что в неродственных белках эти последовательности совершенно различны. Белки лишь в том случае имеют сходную последовательность аминокислот, если они происходят от общего белка-предшественника. Следовательно, изучение последовательностей аминокислот в белках позволяет проследить эволюцию на молекулярном уровне.

Белки – называют также протеинами. Последний термин, введенный Барцелиусом в 1838 г.[1], подчеркивает важное значение этого класса веществ. Термин образован от греческого слова *proteios*, что означает «первостепенный».

2.7. Экспериментальные методы определения последовательности аминокислот

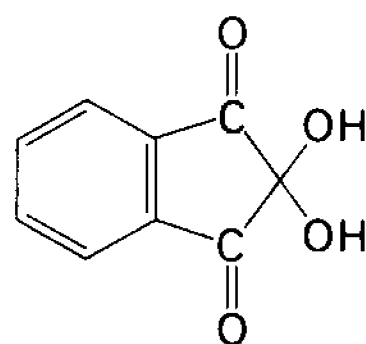
Рассмотрим сначала, как можно определить последовательность аминокислот в коротком пептиде. Допустим, что пептид состоит из 6 аминокислотных остатков, расположенных в следующей последовательности:

Ala-Cly-Asp-Phe-Arg-Gly.

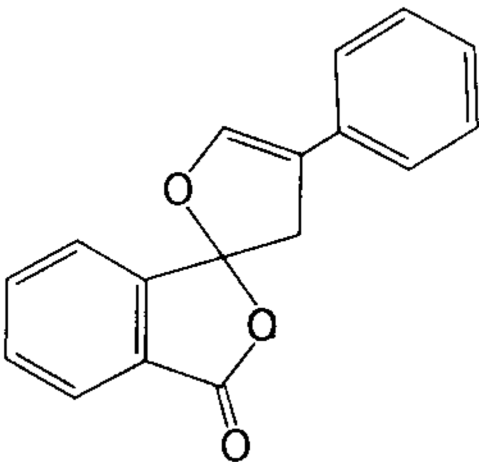
(Для обозначения аминокислот использованы общепринятые сокращения, приведенные в табл. 2.1, стр. 23.) Прежде всего необходимо определить *аминокислотный состав пептида*. Для этого его гидролизуют до составляющих аминокислот нагреванием до 110°C в течение 24 ч в 6 н. HCl. Далее аминокислоты полученного гидролизата разделяют методом ионообменной хро-

[1] Термин «протеин» введен Мулдером (Lieben F. Geschichte der Physiologischen Chemie, Leipzig und Wien, I. Deutike, 1935, s. 359).– *Прим. ред.*

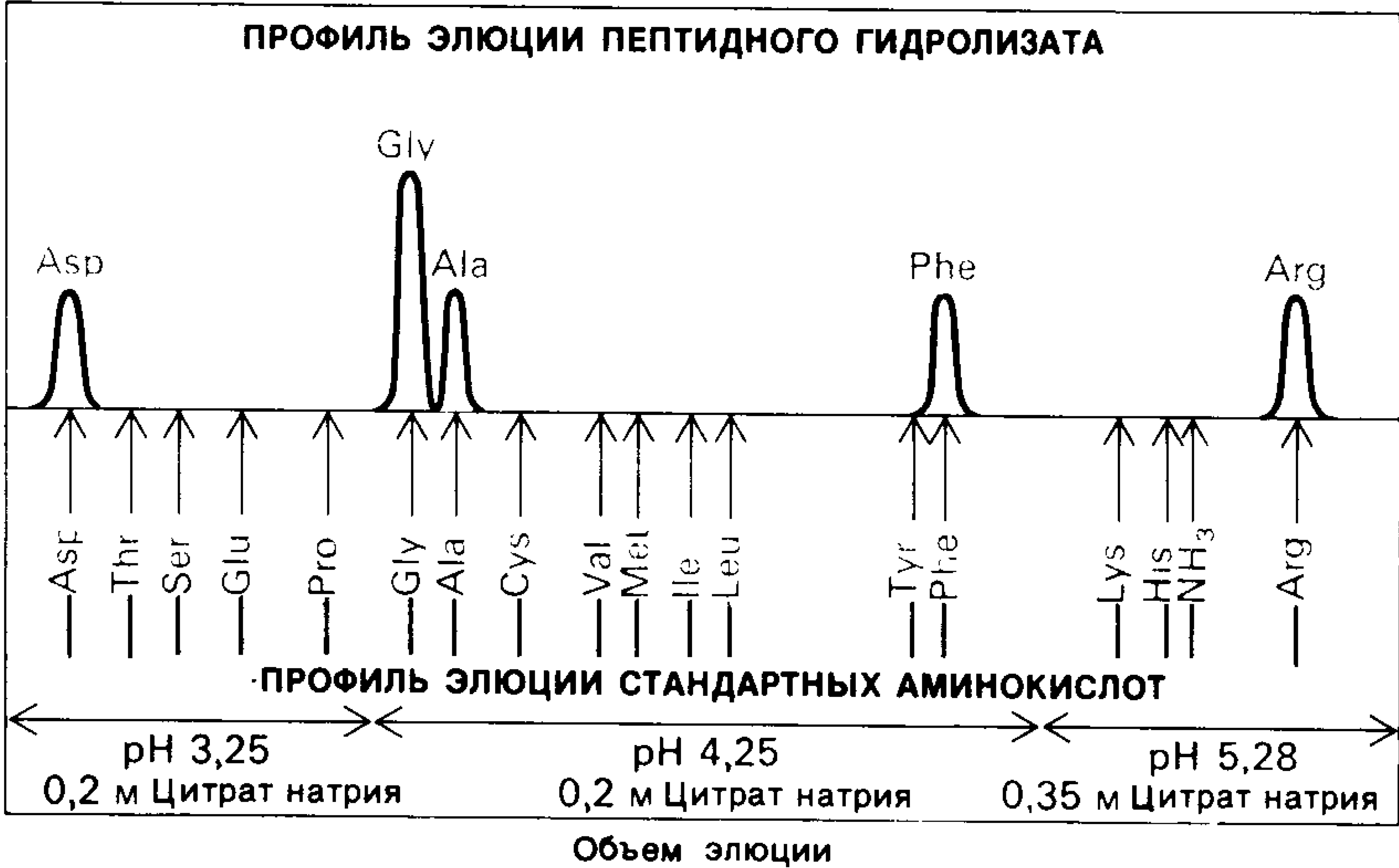
матографии на колонке с сульфонированным полистиролом. Фракционированные аминокислоты определяют по окраске, образующейся при нагревании с *нингидрином*: α-аминокислоты дают с нингидрином интенсивное синее окрашивание, а иминокислоты, например пролин,– желтое. Метод ионообменной хроматографии обладает высокой чувствительностью: с его помощью можно определить даже один микрограмм аминокислоты, т. е. примерно столько, сколько содержится в одном отпечатке пальца. Количество аминокислоты пропорционально оптической плотности раствора после нагревания с нингидрином. Если требуется определить еще меньшие количества аминокислоты – порядка нескольких нанограммов, то используют *флуорескамин*, который реагирует с α-аминогруппой, образуя сильно флуоресцирующее соединение. О природе аминокислоты судят по объему элюции, т. е. по объему буфера, использованному для вымывания данной аминокислоты с колонки (рис. 2.26). Сравнение результатов хроматографии гидролизата со стандартной смесью аминокислот свидетельствует о том, что исследуемый пептид имеет следующий аминокислотный состав:



Нингидрин



Флуорескамин

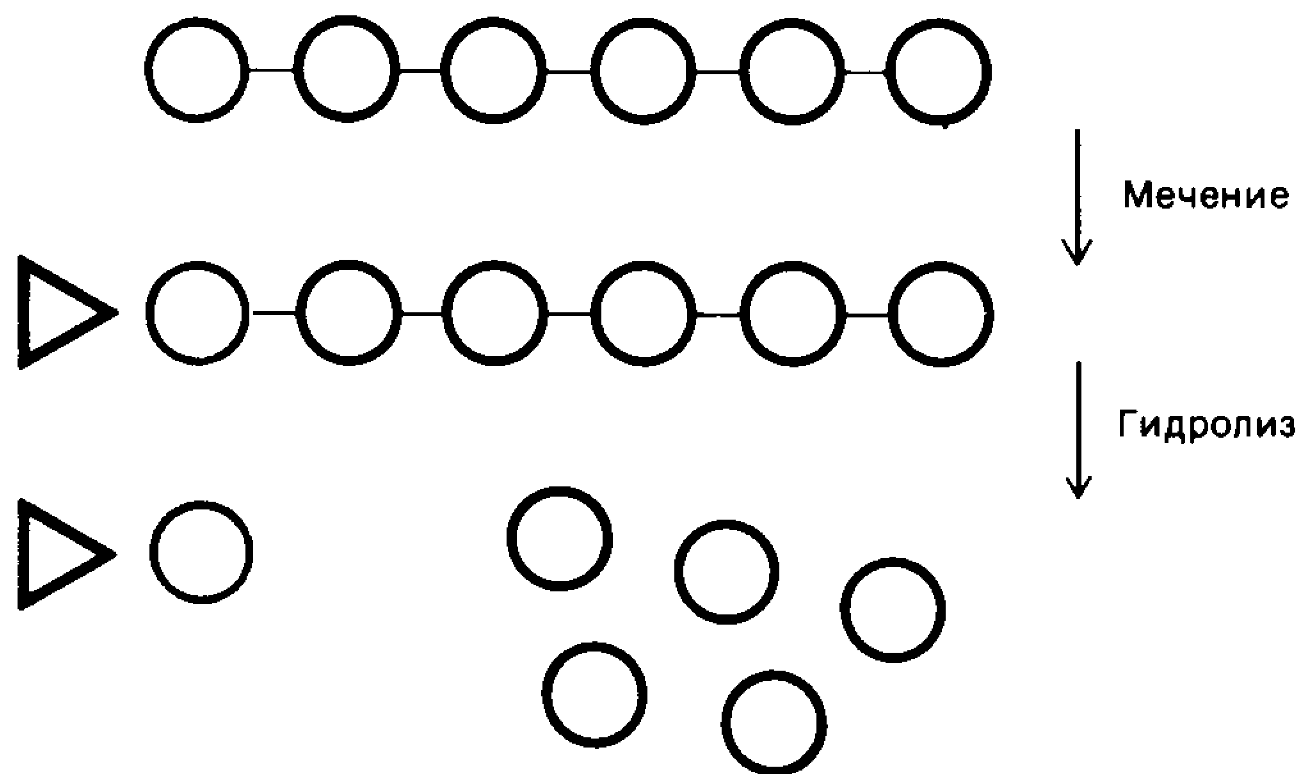


Объем элюции

Рис. 2.26. Аминокислоты, содержащиеся в гидролизате белка, разделяют методом ионообменной хроматографии на сульфонированном полистироле (например, дауэкс-50). Для элюции аминокислот с колонки используют буферы с возрастающим значением pH. Первым снимается с колонки аспартат, имеющий кислотную боковую цепь; аргинин с основной боковой цепью элюируется последним. По оси ординат отложено поглощение.

(Ala, Arg, Asp, Gly_2, Phe).

Скобки показывают,что речь идет о составе, а не последовательности аминокислот в пептиде.



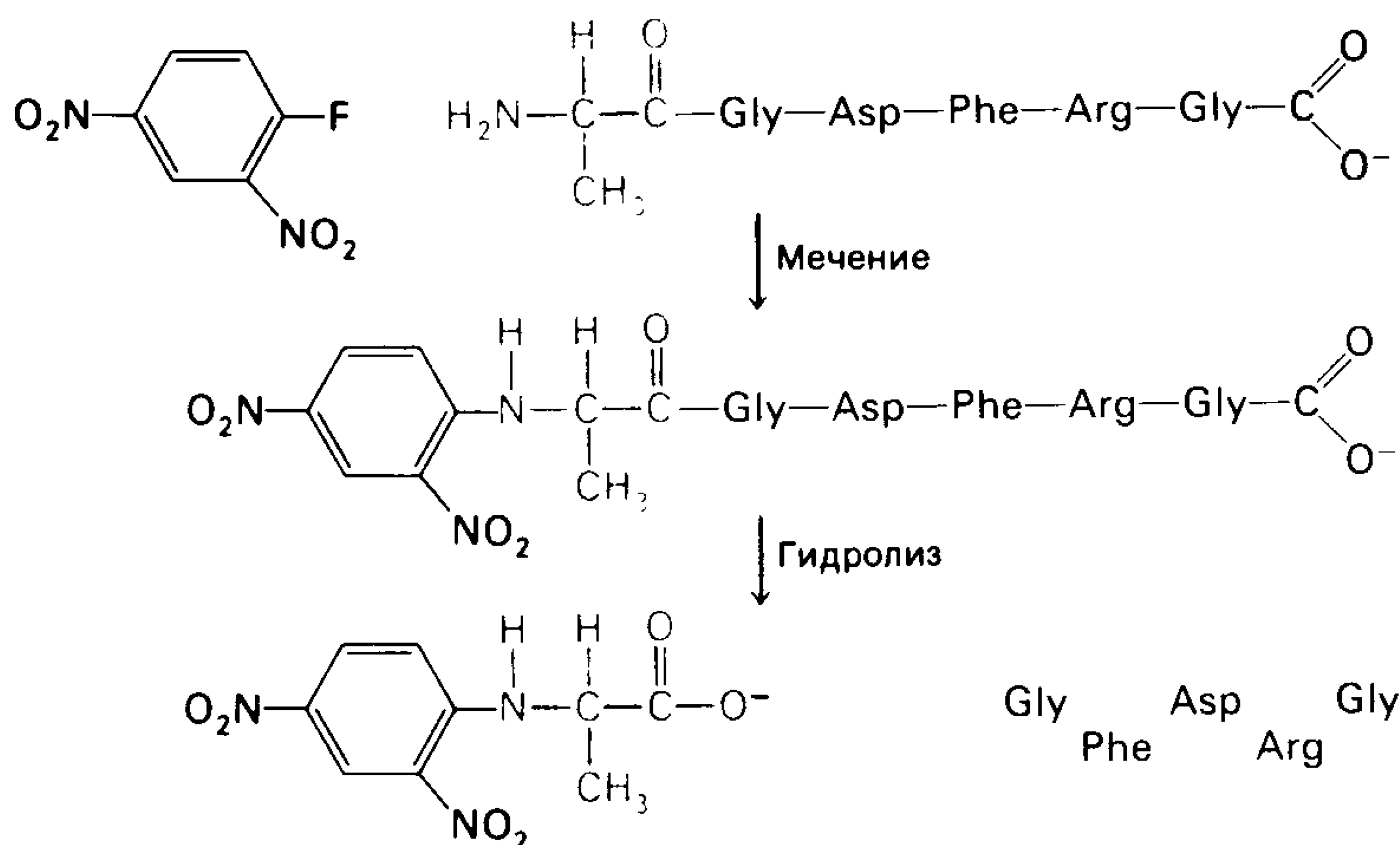
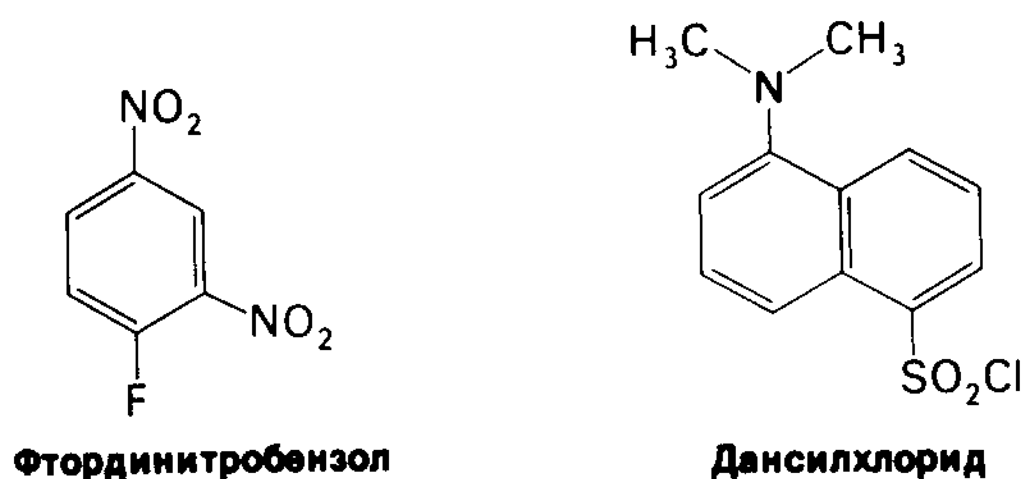


Рис. 2.27. Определение N-концевого остатка пептида. Пептид метят фтординитробензолом (реактив Сэнгера) и затем гидролизуют. ДНФ-производное аминокислоты (в приведенном примере ДНФ-аланин) идентифицируют по хроматографическим характеристикам.

Для определения в белке или пептиде концевого остатка, несущего аминогруппу, его метят с помощью соединения, образующего стабильную ковалентную связь с азотом аминогруппы (рис. 2.27). Впервые для этой цели Сэнгер использовал *фтординитробензол* (ФДНБ), реагирующий с незаряженной α-NH_2-группой с образованием динитрофенильного (ДНФ) производного пептида желтого цвета. Связь между ДНФ и концевой аминогруппой стабильна в условиях, используемых для гидролиза пептидных связей. Поэтому при гидролизе ДНФ-производного пептида Ala-Gly-Asp-Phe-Arg-Gly в 6 н. HCl высвобождается ДНФ-аминокислота, которую можно идентифицировать хроматографически как ДНФ-аланин.

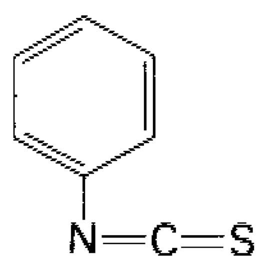
Для идентификации N-концевых аминокислот в настоящее время часто используют *дансилхлорид*, который при взаимодействии с аминогруппой дает стабильное, интенсивно флуоресцирующее сульфамидное производное. Этот метод позволяет выявить N-концевую аминокислоту (после кислотного гидролиза пептидных



Фтординитробензол **Дансилхлорид**

связей), присутствующую в таком незначительном количестве, как несколько нанограммов.

При всех достоинствах методов определения N-концевых аминокислотных остатков с помощью ДНФ или дансилхлорида их, к сожалению, нельзя использовать дважды применительно к одному и тому же пептиду, поскольку последний полностью распадается при кислотном гидролизе. Перу Эдману (P. Edman) удалось разработать метод маркирования N-концевого остатка и отщепления его от пептида без сопутствующего расщепления остальных пептидных связей. *Деградация по Эдману (реакция Эдмана)* состоит в ступенчатом (по одному) отщеплении аминокислотных остатков с аминоконца пептида (рис. 2.28). *Фенилизотиоцианат* реагирует с незаряженной концевой



Фенилизотиоцианат

аминогруппой пептида с образованием фенилтиокарбамоильного производного. Далее в слабокислой среде происходит отщепление циклического производного N-концевой аминокислоты, а оставшийся неразрушенным пептид оказывается укороченным на один аминокислотный остаток. Указанное циклическое производное представляет собой фенилтиогидантоин-аминокислоту (ФТГ-аминокислоту). Его идентифицируют методом хроматографии. Далее аминокислотный состав укороченного пептида

(Arg, Asp, Gly_2, Phe)

сравнивают с исходным:

(Ala, Arg, Asp, Gly_2, Phe).

Оказывается, что различие состоит в одном остатке аланина. Следовательно, в исходном пептиде аланин занимает N-концевое положение. Деградацию по Эдману можно вновь повторить на укороченном пептиде. Исходя из аминокислотного состава после второй ступени деградации

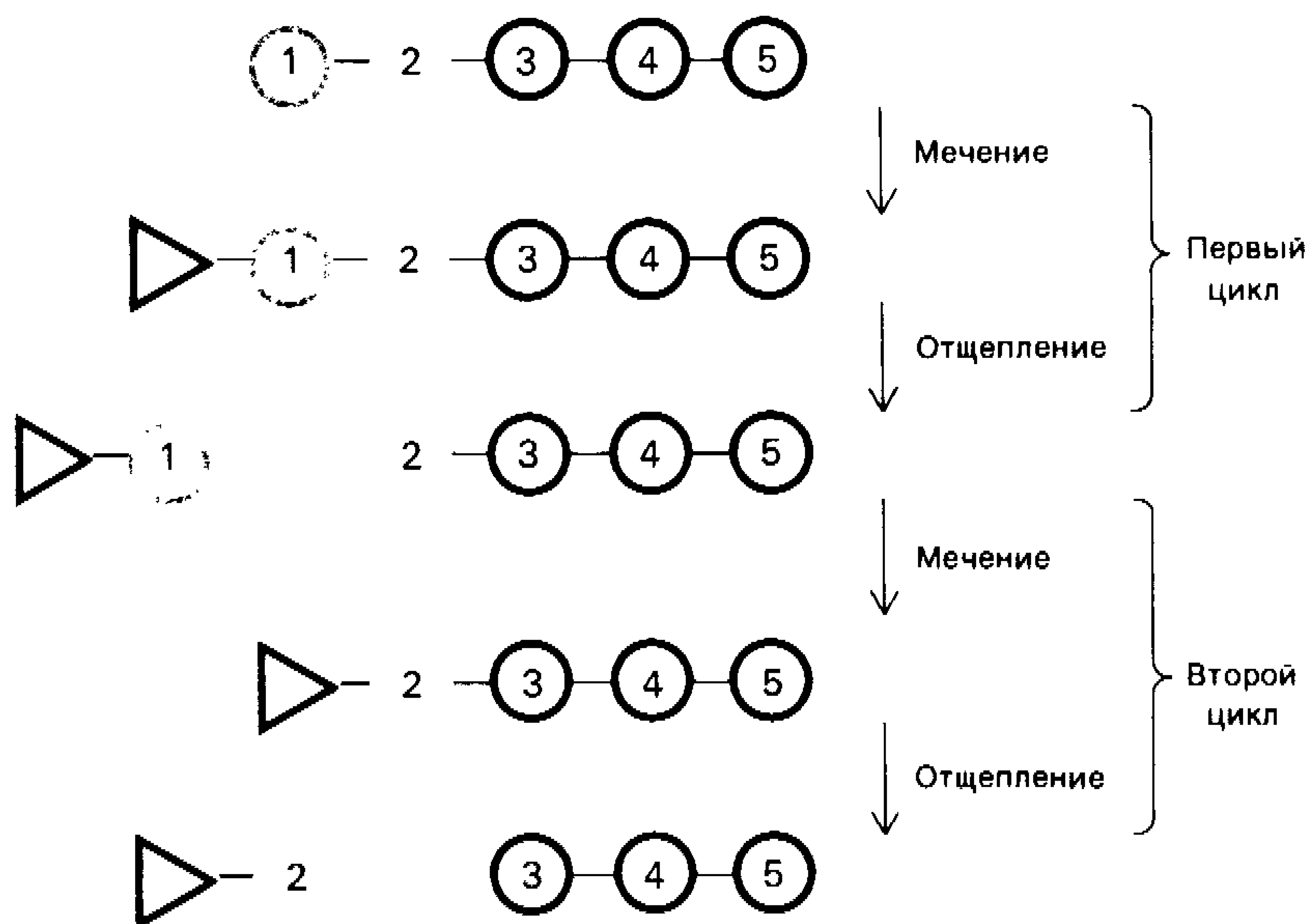
(Arg, Asp, Gly, Phe)

можно прийти к выводу, что вторым остатком с N-конца является глицин. Это заключение подтверждают путем хроматографической идентификации ФТГ-глицина, полученного на второй ступени деградации пептида. Еще три ступени деградации по Эдману позволяют полностью раскрыть последовательность аминокислот во взятом пептиде.

Стратегию анализа последовательности аминокислот в белках можно определить как «разделяй и властвуй». Белок подвергают *специфическому расщеплению на более короткие пептиды*, последовательность аминокислот в которых определяют по Эдману. Специфическое расщепление можно производить химическими или ферментативным методами. Так, Б. Уиткоп (B. Witkop) и Э. Гросс (E. Gross) обнаружили, что бромистый циан (CNBr) расщепляет полипептидную цепь только по пептидной связи, образованной карбоксильной группой остатка метионина (рис. 2.29). Если в белке содержится 10 метиониновых остатков, то после обработки бромистым цианом обычно получается 11 пептидов. Высокоспецифическое расщепление достигается также с помощью трипсина – протеолитического фермента поджелудочной железы. Трипсин расщепляет полипептидные цепи по пептидной связи, образованной карбоксильной группой остатков аргинина и лизина (рис. 2.30). В результате белок, содержащий 9 остатков лизина и 7 остатков аргинина, после расщепления трипсином распадается на 17 пептидов. Каждый из этих пептидов, кроме пептида, расположенного на карбоксильном конце белка, будет кончаться аргинином или лизином. Ряд других способов специфического расщепления полипептидных цепей приведен в табл. 2.2.

Пептиды, полученные при специфическом химическом или ферментативном расщеплении белка, разделяют методами хроматографии. Далее последовательность аминокислот в каждом из пептидов определяют методом Эдмана. Таким образом, достигается этап, когда последовательность аминокислот в отдельных пептидах (фрагментах белка) известна, но остается невыясненной последовательность самих пептидов. Последнюю устанавливают с помощью так называемых *перекрывающихся пептидов* (рис. 2.31). При этом используют уже не трипсин, а какой-либо фермент, расщепляющий полипептидную цепь в других участках, например химотрипсин, который расщепляет пептидные связи главным образом по

ДЕГРАДАЦИЯ ПО ЭДМАНУ



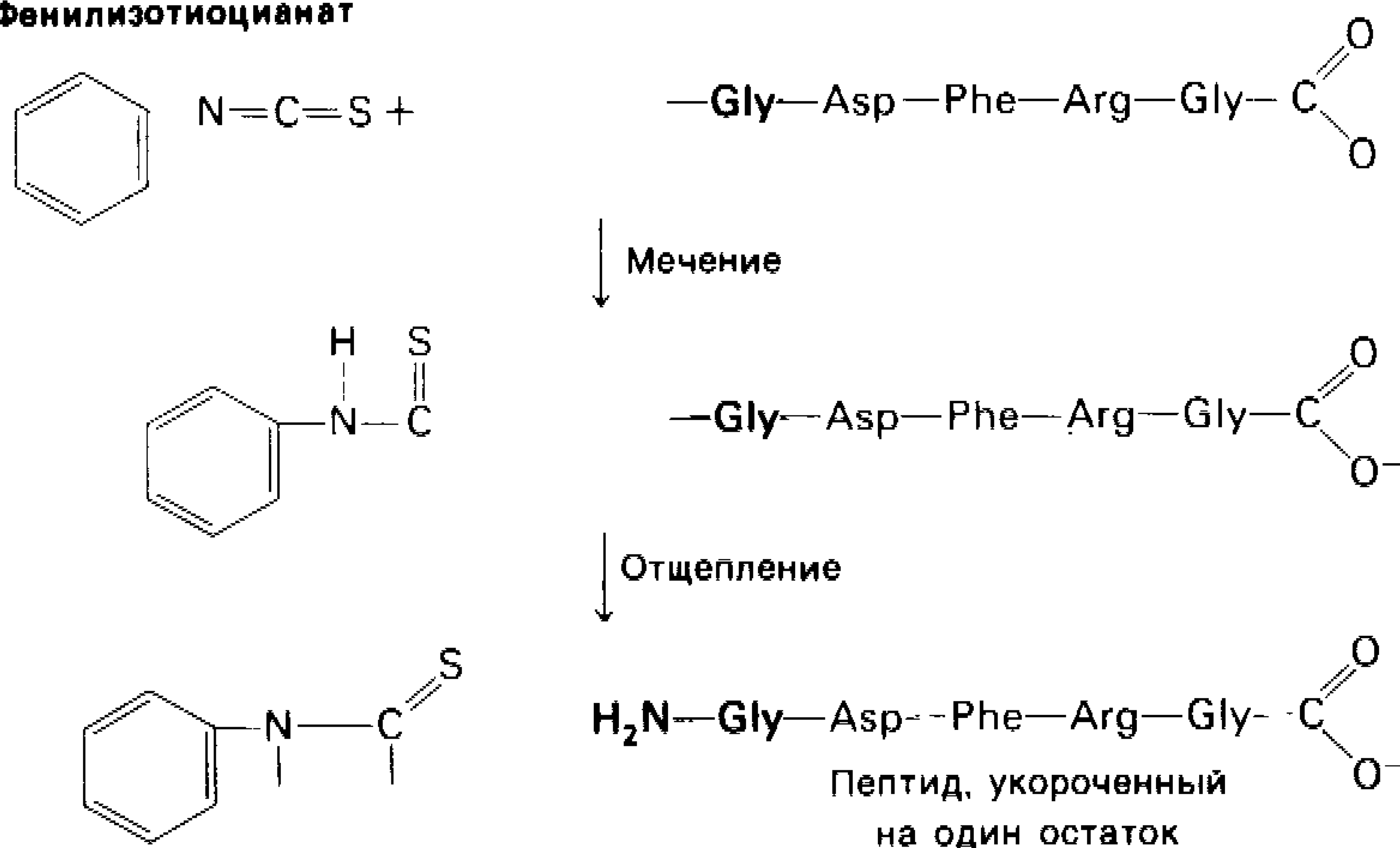


Рис. 2.28. Деградация по Эдману. От пептидной цепи отщепляют меченый N-концевой остаток аминокислоты (ФТГ-аланин на первой ступени деградации). Остаток пептидной цепи при этом не гидролизуется. На второй ступени деградации определяют следующий N-концевой аминокислотный остаток. Еще три ступени деградации по Эдману позволят установить всю последовательность аминокислот во взятом пептиде.



Рис. 2.29. Бромистый циан расщепляет полипептиды по карбоксильной группе метиониновых остатков.

карбоксильным группам ароматических и других больших неполярных аминокислотных остатков. Пептиды, образующиеся под действием химотрипсина, неизбежно перекрывают два или более триптических пептида, что используется для установления их последовательности. Таким путем полностью определяют последовательность аминокислот в белке.

Описанные методы применимы к белкам, состоящим из одной полипептидной цепи, не имеющей дисульфидных связей. В тех же случаях, когда в белке имеются дисульфидные связи или более одной полипептидной цепи, то необходимы дополнительные методические приемы. Например, если белок содержит две или более полипептидные цепи, соединенные нековалентными связями, то, воздействуя денатурирующими агентами, такими, как мочевина или гуанидингидрохлорид, вызывают диссоциацию цепей. Диссоциированные цепи разделяют и только после этого приступают к определению последовательности аминокислот в каждой из них. Если же полипептидные цепи соединены ковалентными дисульфидными связями, как это имеет место в инсулине, то их окисляют надмуравьиной кислотой; при этом дисульфидные связи разрываются и образуются остатки цистеиновой кислоты (рис. 2.32).

Анализ структуры белков удалось значительно ускорить путем создания *секвенатора* – специального прибора для автоматического определения последовательности аминокислот. При таком определении белок в виде тонкой пленки помещают во вращающийся цилиндрический сосуд, где он подвергается деградации по Эдману. Реактивы и растворители проходят над иммобилизованной белковой пленкой, а высвобождающиеся ФТГ-аминокислоты подвергаются жидкостной хроматографии при высоком давлении и таким образом идентифицируются. Один цикл деградации по Эдману занимает при этом менее двух часов. С помощью секвенатора можно определить аминокислотную последовательность полипептида или белка, содержащего до ста аминокислотных остатков.

Таблица 2.2. **Специфическое расщепление полипептидов**

Реактив	Место расщепления пептидных связей, образованных:
Химическое расщепление	
Бромистый циан	Карбоксильной группой остатков метионина
Гидроксиламин	Связь аспарагин—глицин
2-Нитро-5-тиоцианобензоат	Аминогруппой цистеиновых остатков
Ферментативное расщепление	
Трипсин	Карбоксильной группой остатков лизина и аргинина
Клострипаин	Карбоксильной группой остатков аргинина
Стафилококковая протеиназа	Карбоксильной группой остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот (глутаминовой кислотой – только в определенных условиях)

2.8. Конформация полипептидных цепей

Поразительная особенность белков состоит в том, что каждый из них имеет четко определенную трехмерную структуру. Как показано ниже, будучи развернутыми или уложенными случайным образом, полипептидные цепи лишены биологической активности. Функциональные свойства белков определяются их *конформацией*, т. е. пространственным расположением атомов.

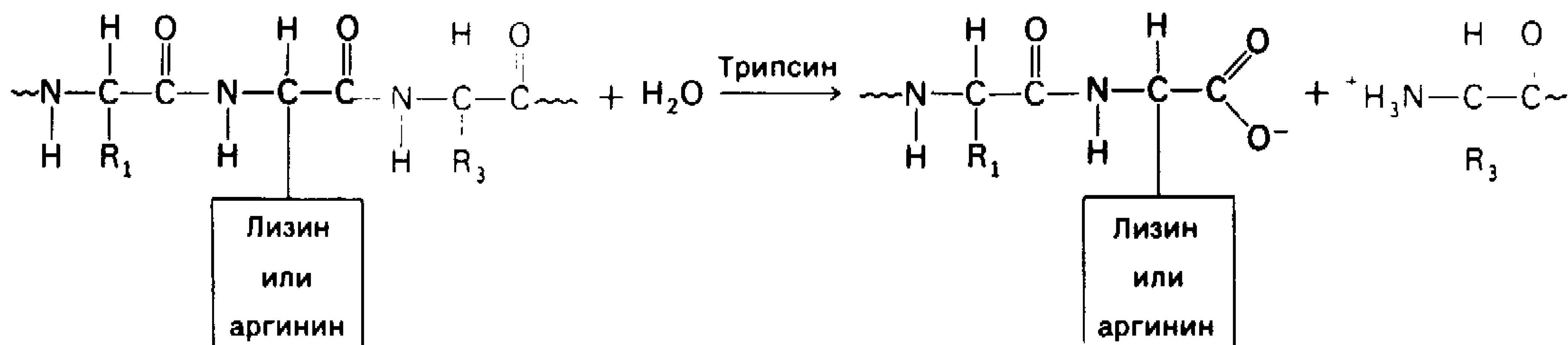


Рис. 2.30. Трипсин гидролизует полипептиды по карбоксильной группе остатков лизина и аргинина.

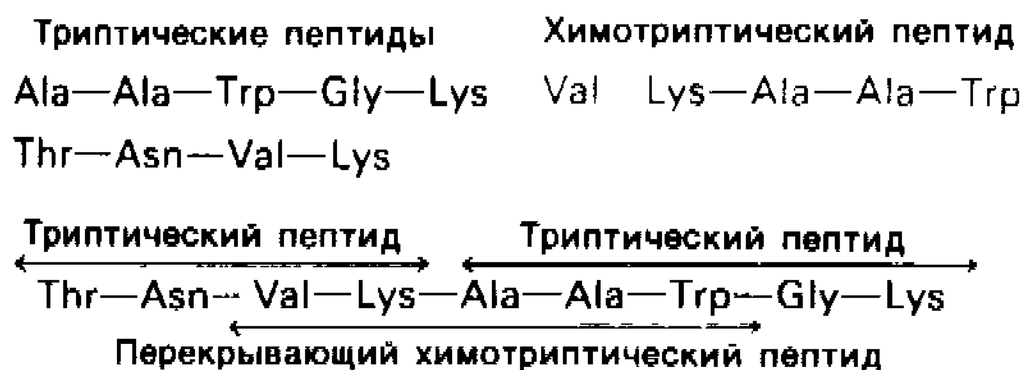


Рис. 2.31. Пептид, образующийся при химотриптическом расщеплении, перекрывает два триптических пептида; благодаря этому можно установить последовательность расположения пептидов.

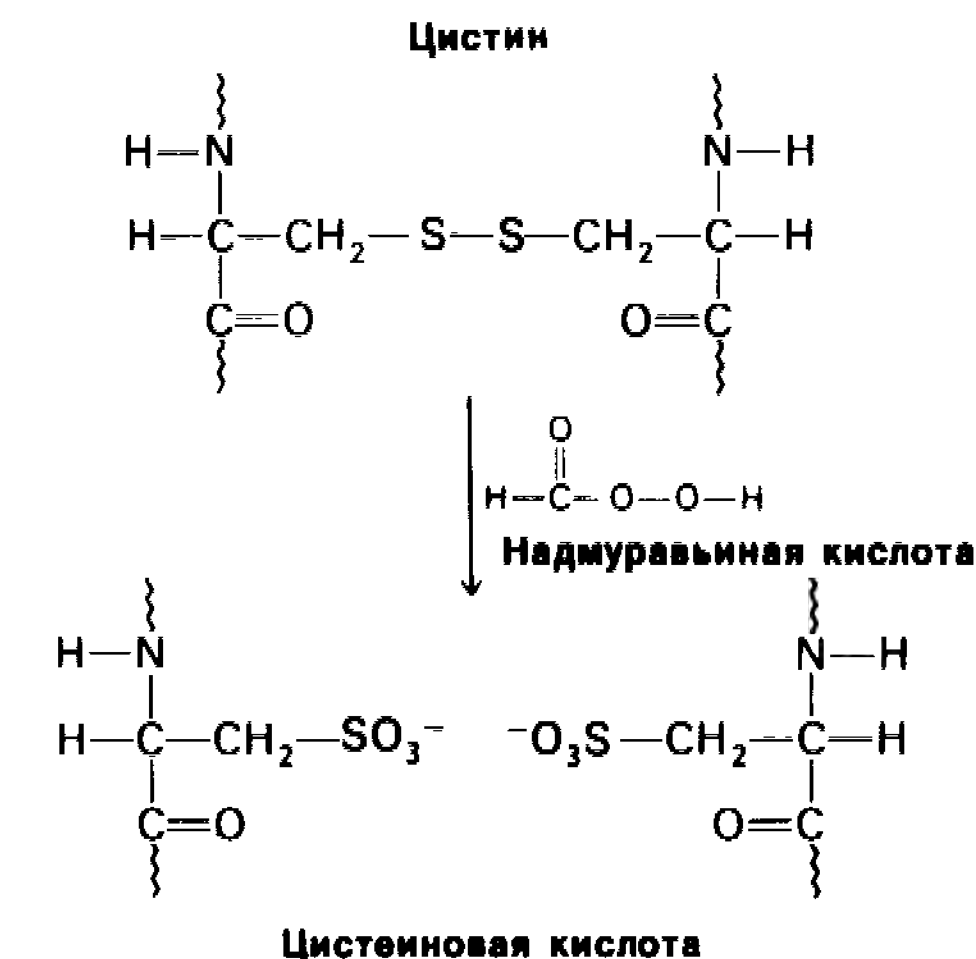


Рис. 2.32. Дисульфиды расщепляются надмуравьиной кислотой.

Важную роль при этом играет последовательность аминокислот, так как в конечном счете именно она определяет конформацию белка.

В конце 30-х годов Л. Полинг (L. Pauling) и Р. Кори (R. Corey) начали проводить рентгеноструктурные исследования аминокислот и петидов. Они определяли стандартные длины и углы связей, с тем чтобы исходя из этих данных предсказать конформацию белков. Был обнаружен важный факт: *пептидная единица обладает жесткой планарной (плоской) структурой*. Водород в замещенной аминогруппе почти всегда занимает *транс*-положение по отношению к кислороду карбонильной группы (рис. 2.33). Связь между атомом углерода карбонильной группы и атомом азота пептидной единицы имеет частично характер двойной связи, и, следовательно, вращение вокруг этой (рис. 2.34) связи должно быть заторможено. Длина связи составляет 1,32 Å – среднее значение между длинами одинарной связи C—N (1,49 Å) и двойной связи C=N (1,27 Å).

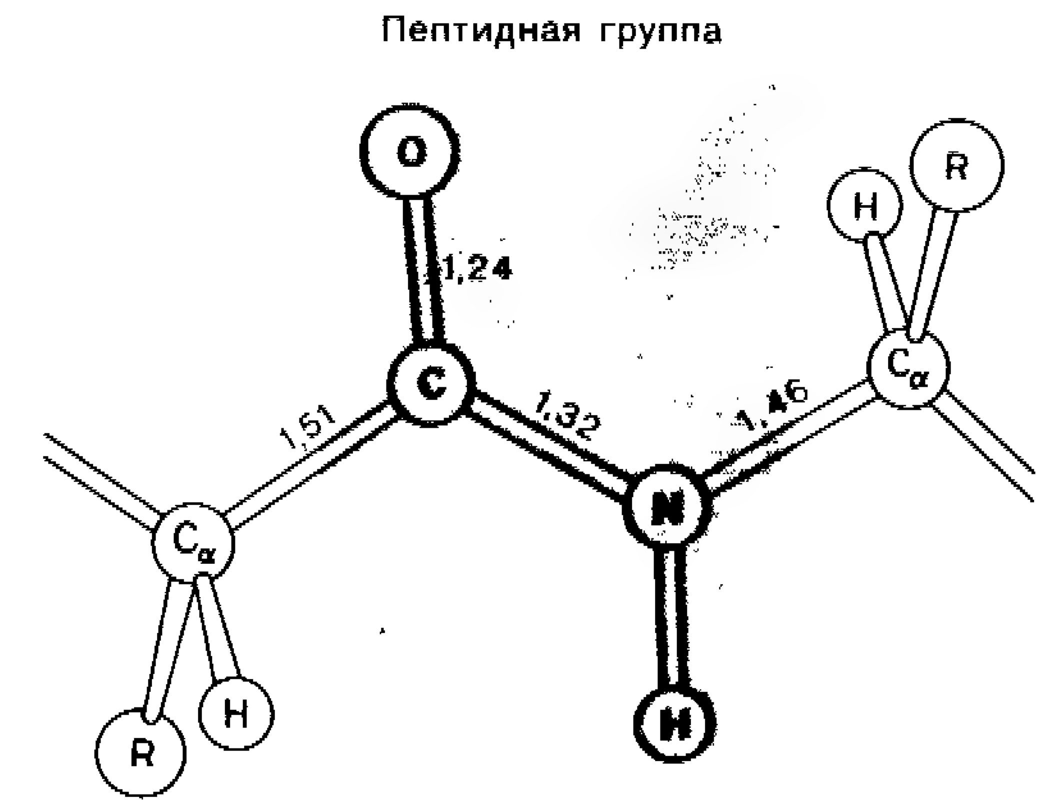


Рис. 2.33. Пептидная группа имеет жесткую планарную структуру. Показаны длины связей (в Å).

Ангстрем (Å) –
единица длины, равная 10^{-10} м. 1 Å = 10^{-10} м = 10^{-8} см = 10^{-4} мкм = = 10^{-1} нм. Названо в честь ученого-спектроскописта А. Ангстрема (1814–1874).

В отличие от рассмотренного случая связь между α-углеродным атомом и углеродным атомом карбонильной группы истинно одинарная. *Следовательно, по обеим сторонам жесткой пептидной единицы вокруг этих связей имеется высокая степень свободы вращения* (рис. 2.35). Вращения относительно этих связей описываются углами ψ и φ (рис. 2.36).

Для полного описания конформации основной цепи полипептида необходимо знать ψ и φ для каждого аминокислотного остатка.

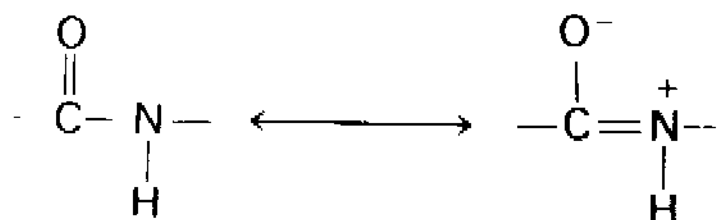


Рис. 2.34. Планарность пептидной группы обусловлена тем, что связь азот–углерод носит частично характер двойной связи.

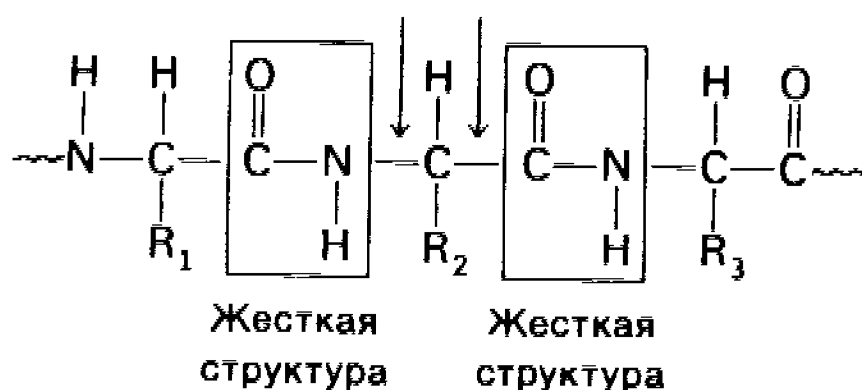


Рис. 2.35. В области связей между пептидными группами и α-углеродными атомами имеется довольно высокая степень свободы вращения.

2.9. Периодичные структуры: альфа-спираль, бета-складчатый слой, спираль коллагена

Может ли полипептидная цепь быть уложена в структуру, состоящую из регулярно повторяющихся участков? Чтобы ответить на этот вопрос, Полинг и Кори сравнили ряд потенциально возможных конформаций полипептидов, построив их точные молекулярные модели. При этом строго соблюдались экспериментально установленные для аминокислот и небольших пептидов величины углов связей и межатомных расстояний. В 1951 г. они предложили две периодические полипептидные структуры, названные соответственно α-спираль и β-складчатый слой.

α-Спираль имеет вид стержня. Туго закрученная основная цепь полипептида создает внутреннюю часть стержня, а боковые цепи направлены наружу от основной цепи, рас-

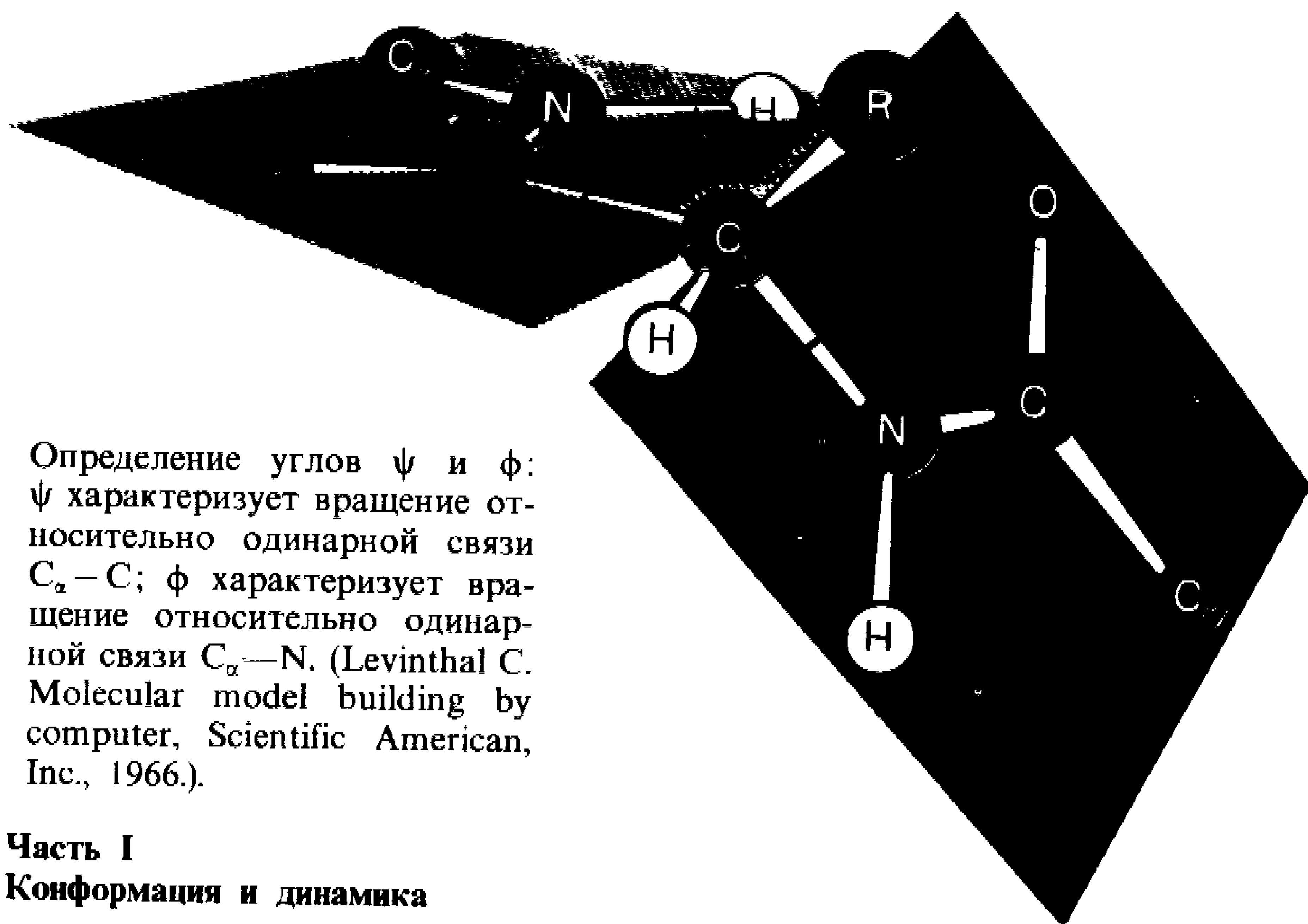


Рис. 2.36. Определение углов ψ и φ: ψ характеризует вращение относительно одинарной связи C_α–C; φ характеризует вращение относительно одинарной связи C_α—N. (Levinthal C. Molecular model building by computer, Scientific American, Inc., 1966.).

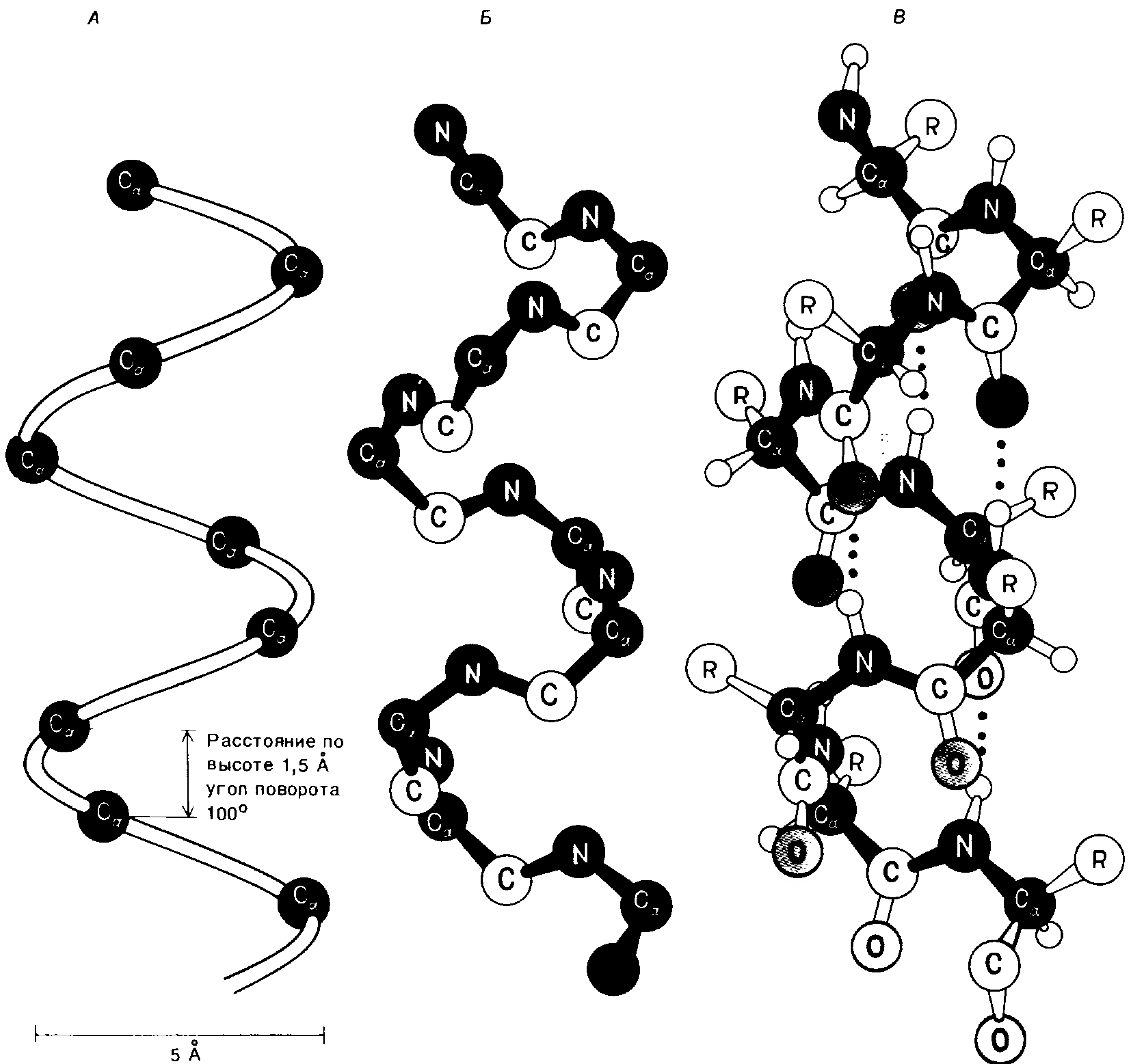


Рис. 2.37. Модель правозакрученной α-спирали. *А*. На спирали показаны только α-углеродные атомы. *Б*. Показаны только атомы азота (N), образующие скелет молекулы, атомы α-углерода (C_α) и карбонильного углерода (C). *В*. Полное изображение спирали. Водородные связи (на рис. *В* обозначены красными точками) между NH- и CO-группами стабилизируют спираль.

полагаясь по спирали (рис. 2.37 и 2.38). α-Спираль стабилизирована водородными связями между NH- и CO-группами основной цепи. CO-группа каждой аминокислоты соединяется водородной связью с NH-группой аминокислоты, расположенной в линейной последовательности на 4 остатка впереди (рис. 2.39). Таким образом, *все CO- и NH-группы основной цепи связаны между собой водородными связями*. В проекции на ось спирали один остаток отстоит от другого на 1,5 Å, а угол между ними составляет 100°, т.е. на полный виток спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка. Таким образом, аминокислоты, отстоящие друг от друга на 3–4 остатка в линейной последовательности, в структуре α-спирали пространственно расположены очень близко друг к другу. Напротив, аминокислоты, разделенные в линейной последовательности двумя остатками, пространственно располагаются на противоположных сторонах спирали и поэтому взаимодействие между ними маловероятно. Шаг α-спирали состав-

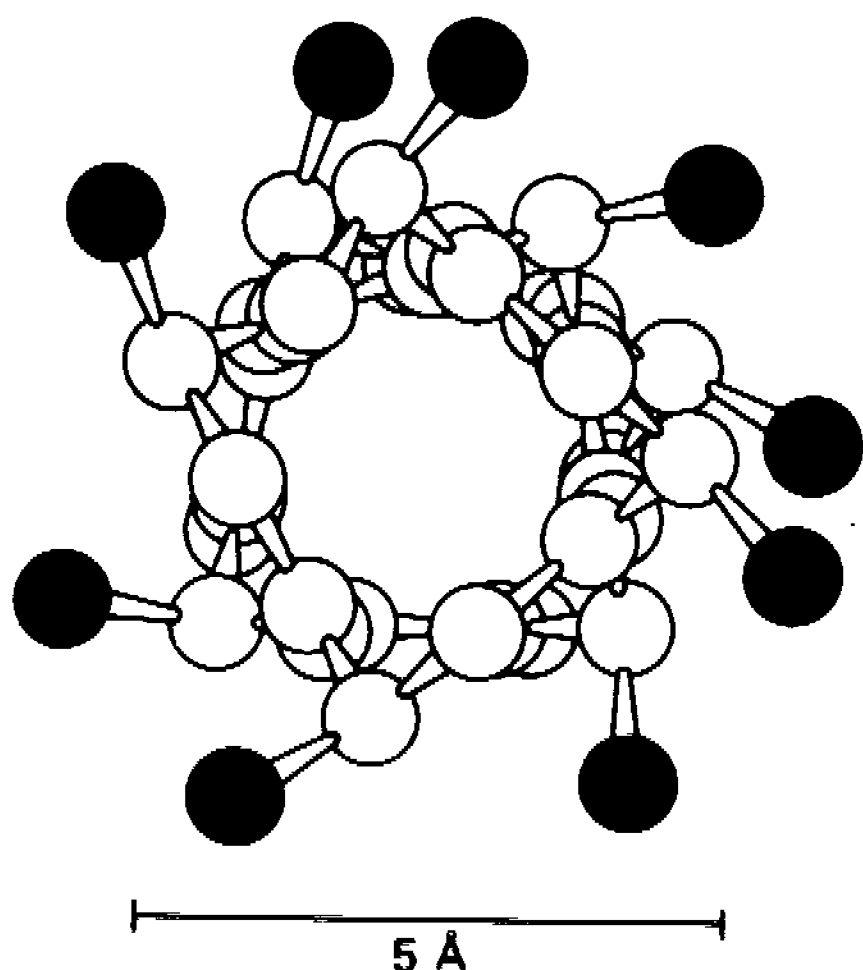


Рис. 2.38. α-Спираль в поперечном разрезе. Обратите внимание, что боковые цепи (показаны зеленым) находятся снаружи спирали. Вандерваальсовы радиусы атомов на самом деле больше, чем изображено на рисунке; вследствие этого внутри спирали почти нет свободного пространства.

ляет 5,4 Å, расстояние между остатками (по оси)–1,5 Å и число остатков на один оборот–3,6. Спираль может закручиваться по часовой стрелке (правая спираль) или против часовой стрелки (левая спираль); все исследованные α-спирали белков относятся к правому типу.

Содержание α-спиралей в белках, изученных к настоящему времени, крайне вариабельно. В некоторых белках, например миоглобине и гемоглобине, α-спираль лежит в основе структуры. Другие белки, например пищеварительный фермент химотрипсин, практически лишены α-спиральной структуры. Одинарная α-спираль, о которой речь шла выше, как правило, довольно коротка, обычно менее 40 Å в длину. Варианты α-спиралей используются при образовании длинных тяжей, достигающих 1000 Å и более в длину. Две или более α-спирали могут закручиваться одна вокруг другой, как тяжи в канате. Такая структура–*α-спирализованная суперспираль*–обнаружена во многих белках: в кератине волос, миозине и тропомиозине мышц, эпидермисе кожи и фибрине, в сгустках крови. Спирализованные «канаты» этих белков выполняют механическую роль, образуя плотные пучки волокон.

«Если принять, что фибриллярные белки эпидермиса, белки кератинизированных тканей, основной белок мышц миозин, а теперь и фибриноген крови–все имеют в основе одну и ту же особую форму молекулярной структуры и потому, вероятно, представляют собой адаптационные варианты одного исходного принципа, то здесь мы, видимо, столкнулись с одним из великих фактов эволюции биологических молекул».

K. Bailey, W.T. Astbury, K.M. Rudall, Nature, 1943

Структура α-спирали была предсказана Полингом и Кори за 6 лет до того, как ее удалось экспериментально выявить методом рентгеноструктурного анализа миоглобина. *Открытие структуры α-спирали представляет собой важную веху в развитии молекулярной биологии, поскольку это открытие доказало, что можно предсказать конформацию полипептидной цепи, если точно известны свойства ее компонентов.*

В тот же год Полинг и Кори открыли другой вариант периодической структуры, который они назвали β-складчатым слоем (β потому, что это была вторая–после α-спирали–открытая ими структура). *β-Складчатый слой* существенно отличается от α-спирали тем, что он имеет плоскую, а не стержневидную форму. Полипептидные цепи в β-складках почти полностью вытянуты (рис. 2.40), а не туго скручены, как в α-спирали. Расстояние по оси между двумя приле-

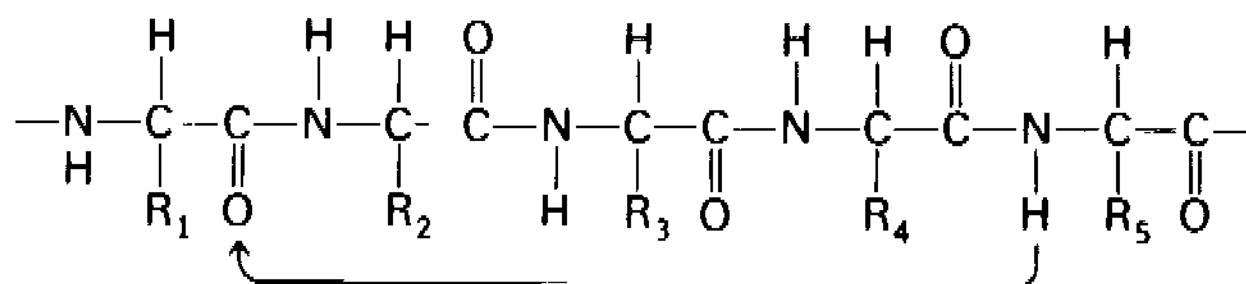


Рис. 2.39. В α-спирали NH-группа *n*-го остатка связана водородной связью с CO-группой остатка (*n* – 4).

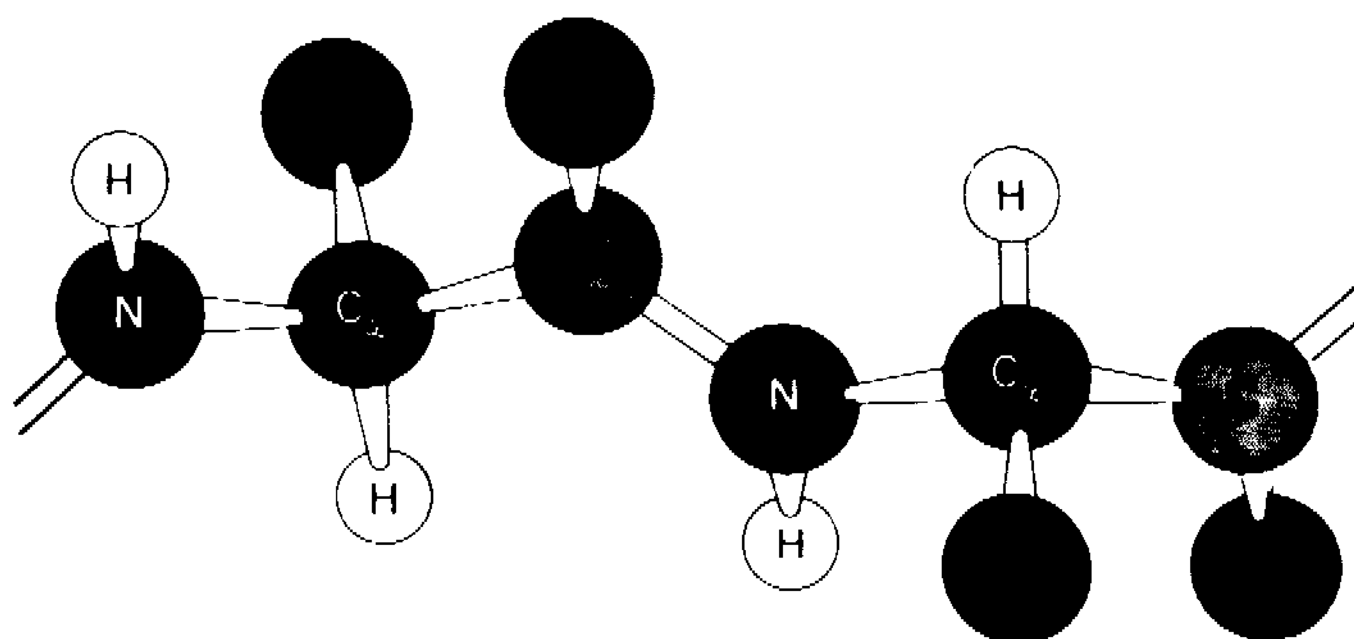


Рис. 2.40. Конформация дипептидной единицы в складчатом β-слое. Полипептидная цепь при этом практически полностью вытянута.

жащими аминокислотами составляет 3,5, а не 1,5 Å, как в α-спирали. Другая особенность β-складчатой структуры состоит в том, что она стабилизирована водородными связями между NH- и CO-группами *разных* тяжей полипептидных цепей, тогда как в α-спирали водородные связи образуются между этими группами в пределах *одной и той же* полипептидной цепи. Прилежащие цепи в складчатом β-слое могут идти в одном и том же направлении (*параллельный β-слой*) или в противоположных направлениях (*антипараллельный β-слой*). Например, фиброин шелка состоит почти целиком из «штабелей» антипараллельных β-складчатых слоев (рис. 2.41). Аналогичные области β-складчатых слоев встречаются во многих других белках. Особенно широко распространены структурные единицы, состоящие из 2–5 параллельных или антипараллельных β-складок.

Третий тип периодической структуры – *коллагеновая спираль* – будет подробно рассматриваться в гл. 9. Эта специализированная структура обеспечивает высокую упругость коллагена – основного компонента кожи, костей и сухожилий.

2.10. Полипептидная цепь может поворачиваться на 180° благодаря образованию β-изгибов

Большинство белков имеют компактную шарообразную (глобулярную) форму, обусловленную тем, что их полипептидные цепи делают много изгибов, меняющих направление цепи на 180°. Исследования трехмерной структуры многочисленных белков показали, что во многих случаях поворот цепи в противоположном направлении осуществляется благодаря наличию одного и того же структурного элемента, называемого *β-изгибом*. Этот изгиб, имеющий вид шпильки для волос, образуется в результате того, что CO-группа остатка *n* в полипептидной цепи присоединяется водородными связями к NH-группе остатка (*n* + 3) (рис. 2.42). В результате направление полипептидной цепи меняется на противоположное.

2.11. Структурные уровни в архитектуре белков

Принято различать четыре структурных уровня в архитектуре белковой молекулы. *Первичная структура* – это просто последовательность аминокислот в белке и локализация дисульфидных мостиков, если таковые имеются. Таким образом, первичная структура представляет собой полное описание ковалентных связей в белке. *Вторичная структура* образуется в результате стерического взаимодействия аминокислотных остатков, расположенных вблизи друг друга в линейной последовательности. Некоторые из этих стерических взаимодействий носят регулярный характер, обусловливая тем самым периодичность структуры. Примерами вторичной структуры могут служить α-спираль, складчатый β-слой и коллагеновая спираль. *Третичная структура* обусловлена стерическим взаимодействием аминокислотных остатков, далеко отстоящих друг от друга в линейной последовательности. Следует отметить, что различие между вторичной и третичной структурами довольно условно. Белки, содержащие несколько полипептидных цепей, обладают еще одним уровнем структурной организации, а именно *четвертичной структурой*. Под четвертичной структурой подразумевают способ

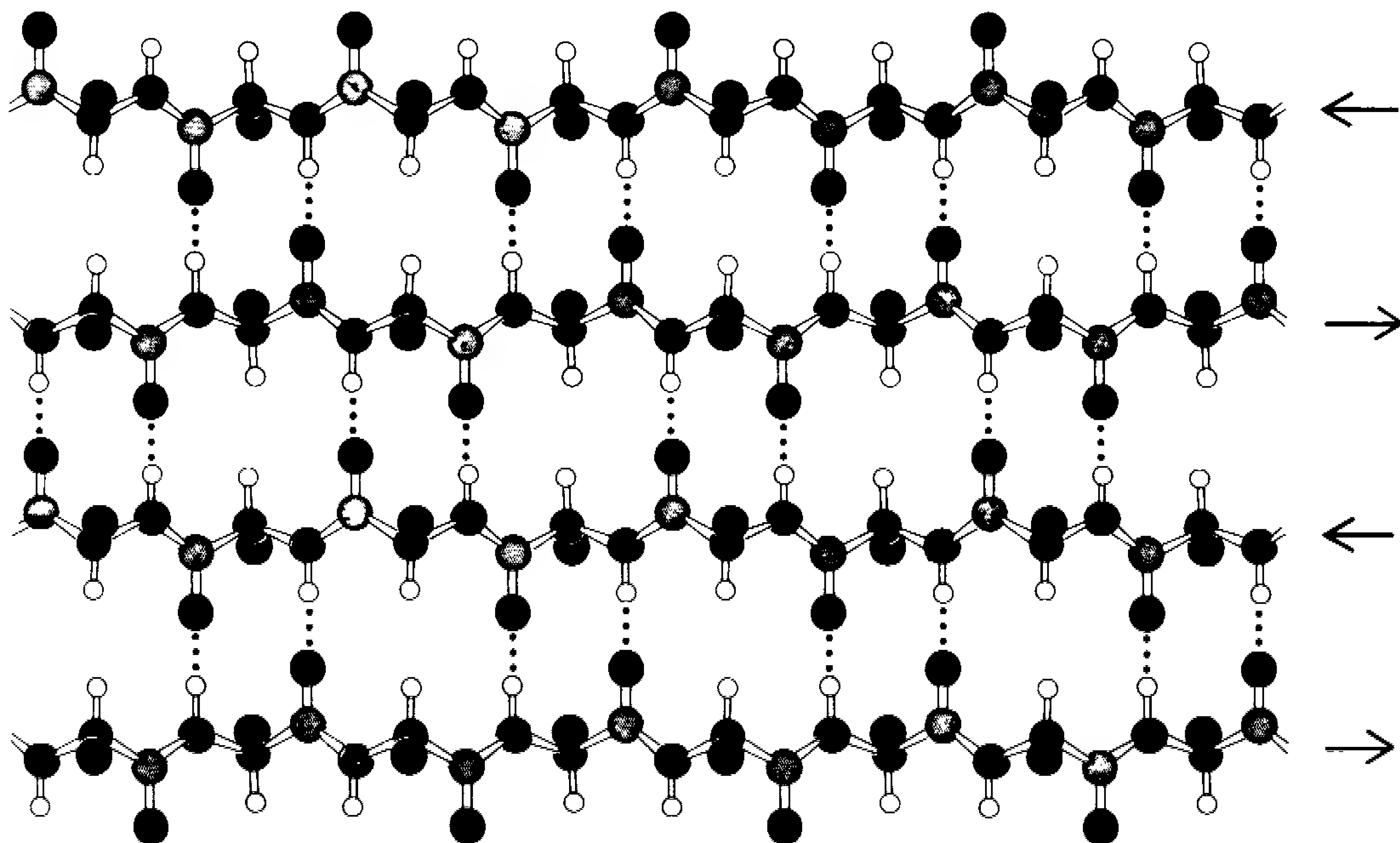


Рис. 2.41. Антипараллельный β-складчатый слой. Прилежащие тяжи полипептидной цепи идут в противоположных направлениях. Структура стабилизирована водородными связями между NH- и CO-группами прилежащих тяжей. Боковые цепи (показаны зеленым) лежат выше и ниже плоскости слоя.

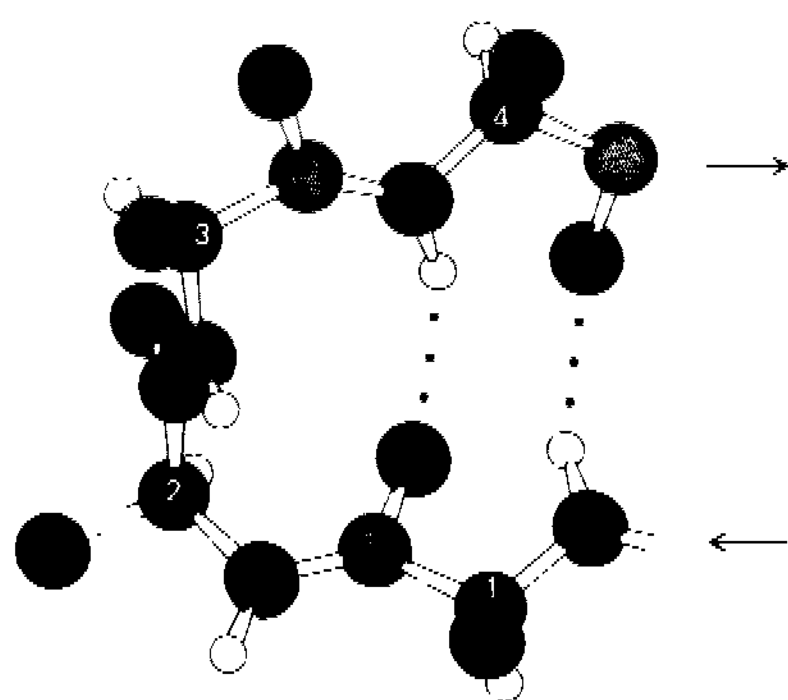
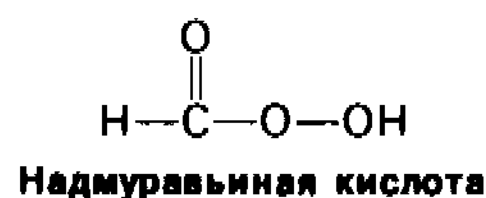


Рис. 2.42. Структура β-изгиба. CO-группа остатка 1 изображенного здесь тетрапептида присоединяется водородными связями к NH-группе остатка 4; в результате образуется такой же изгиб, как в шпильке.

укладки цепей относительно друг друга. Каждая полипептидная цепь в таком белке носит название *субъединицы*. Часто используют также термин *домен*, которым обозначают компактную глобулярную единицу белковой структуры. Многие белки состоят из нескольких доменов с массой от 10 до 20 кДа. В белках большой молекулярной массы отдельные домены соединяются между собой относительно гибкими участками полипептидной цепи.

2.12. Последовательность аминокислот определяет трехмерную структуру

Взаимосвязь между последовательностью аминокислот в белке и его конформацией была обнаружена Кристианом Анфинсеном (C. Anfinsen) при изучении рибонуклеазы – фермента, расщепляющего РНК. Рибонуклеаза образована одной полипептидной цепью, состоящей из 124 аминокислотных остатков (рис. 2.43). Она содержит четыре дисульфидных мостика, которые можно необратимо окислить *надмуравьиной кислотой* с образованием остатков цистеиновой



кислоты (см. рис. 2.32). Можно также вызвать обратимое расщепление этих дисульфидных связей путем восстановления их таким реактивом, как β-*меркаптоэтанол*; при

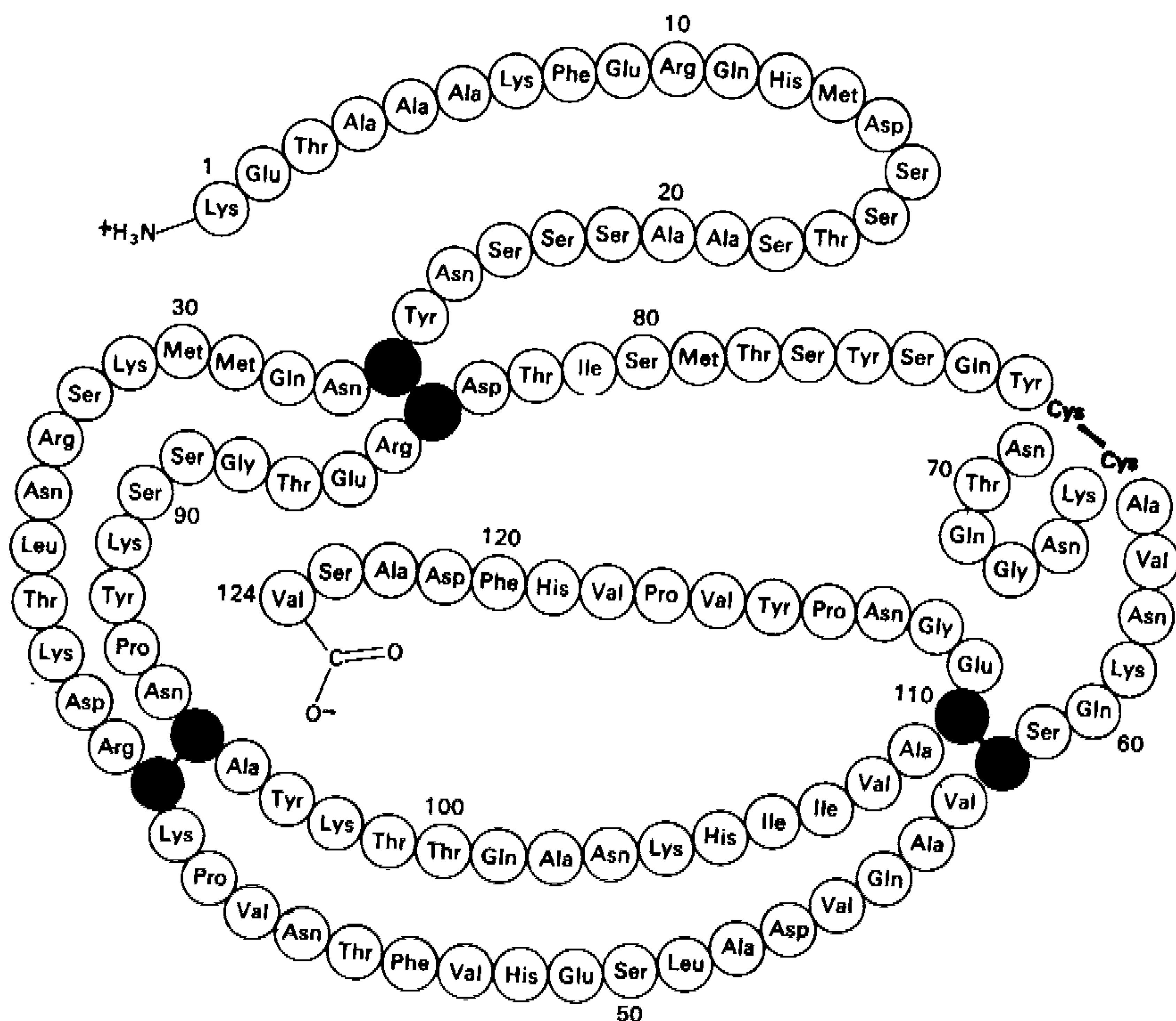
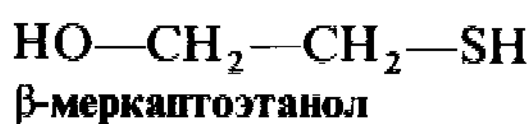
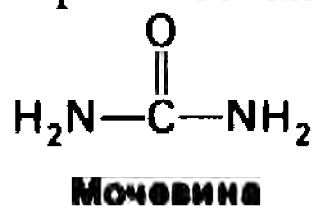


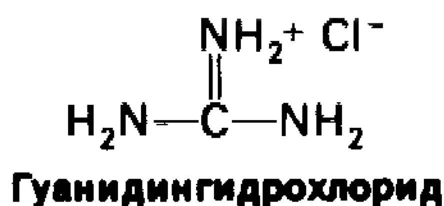
Рис. 2.43. Последовательность аминокислот в рибонуклеазе крупного рогатого скота. Цветом выделены четыре дисульфидные связи. [D. Smyth, W. H. Stein, Moore S., J. Biol. Chem., **238**, 277 (1963).]

этом образуются смешанные дисульфиды



β-меркаптоэтанола с боковыми цепями цистеина (рис. 2.44). В присутствии большого избытка β-меркаптоэтанола смешанные дисульфиды тоже восстанавливаются, и в результате образуется белок, в котором все дисульфидные группы (остатки цистина) полностью превращены в сульфгидрильные (остатки цистеина). Оказалось, однако, что при 37°С и pH 7 реакция восстановления рибонуклеазы β-меркаптоэтанолом протекает





лишь в том случае, если предварительно нарушают компактную структуру белка, частично развертывая его путем обработки денатурирующими агентами (*мочевиной* или *гуанидингидрохлоридом*). Хотя механизм действия этих денатурирующих агентов до конца не выяснен, все же очевидно, что они разрывают нековалентные связи. Полипептидные цепи, лишенные этих связей, в 8 М растворе мочевины или в 6 М растворе гуанидингидрохлорида свертываются случайным образом, т.е. образуют *случайный клубок*, о чем судят по таким физическим параметрам, как вязкость и спектры оптического вращения. Если рибонуклеазу обработать β-меркаптоэтанолом в 8 М растворе мочевины, то продуктом реакции будет полностью восстановленная, случайным образом свернутая полипептидная цепь, *лишенная ферментативной активности*. Другими словами, эта обработка вызывает *денатурацию* рибонуклеазы (рис. 2.45).

Анфинсен сделал очень важное наблюдение: если денатурированную рибонуклеазу очистить путем диализа от мочевины и β-меркаптоэтанола, то ферментативная активность белка постепенно восстанавли-

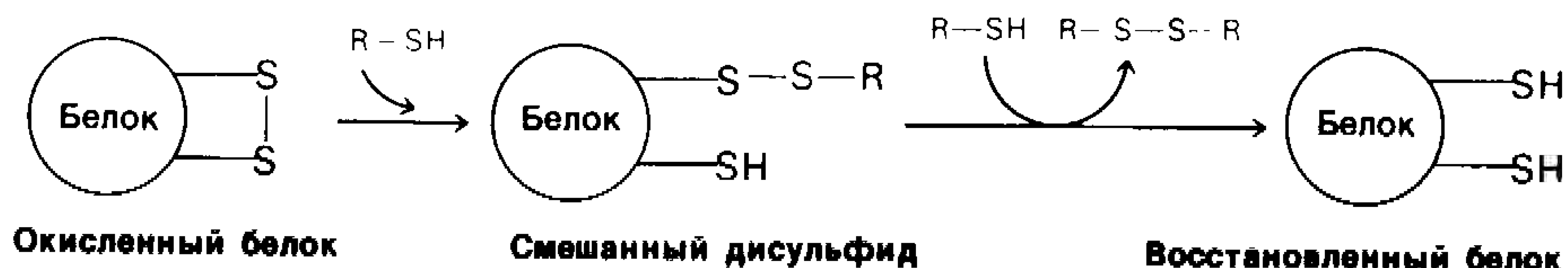


Рис. 2.44. Восстановление дисульфидных связей в белках избытком сульфгидрильного соединения типа β-меркаптоэтанола.

вается. Анфинсен понял, как велико значение этого случайного наблюдения, и тут же дал ему объяснение: сульфгидрильные группы денатурированного фермента окисляются воздухом, и фермент вновь спонтанно принимает каталитически активную форму. Дальнейшие детальные исследования показали, что путем окисления в соответствующих условиях всех сульфгидрильных групп можно практически полностью восстановить исходную ферментативную активность (рис. 2.46). Все исследованные физические и химические свойства такого ренатурированного фермента были практически идентичны свойствам нативного фермента. Эти опыты показали, что *вся информация, определяющая специфическую пространственную структуру рибонуклеазы, заключена в последовательности аминокислот.* Последующие работы на других белках выявили универсальность этого центрального в молекулярной биологии принципа: *последовательность определяет конформацию.*

Совершенно другие результаты получаются, если восстановленную (денатурированную) рибонуклеазу подвергнуть окислению в 8 М растворе мочевины и лишь после этого удалить мочевину путем диализа. Ферментативная активность такого препарата рибонуклеазы составляет только 1% активности нативного белка. Почему при окислении денатурированной рибонуклеазы в отсутствие мочевины ферментативная активность восстанавливается, а в присутствии мочевины – практически нет? Ответ заключается в следующем: когда окислению подвергается случайным образом свернутая молекула восстановленного белка, образуются ошибочные дисульфидные пары, т. е. связанными дисульфидными мостиками оказываются пары аминокислот, иные, чем в нативном белке. Возможны 105 различных способов связывания восьми цистеинов с образованием 4 дисульфидов; только одна из этих комбинаций обладает ферментативной активностью. Остальные 104 комбинации были образно названы «разболтанной» (scrambled) рибонуклеазой. Впоследствии Анфинсен обнаружил, что «разболтанная» рибонуклеаза спонтанно превращается в полностью активную, нативную, форму, если в раствор вновь окисляемого ферментного белка добавить следовые количества β-меркаптоэтанола (рис. 2.47). Добавленный β-меркаптоэтанол катализирует перераспределение дисульфидных мостиков, которое в конечном итоге приводит к формированию нативной структуры, что занимает примерно 10 ч. Весь процесс целиком идет за счет снижения свободной энергии системы по мере того, как «разболтанные» конформации превращаются в стабильную нативную конформа-

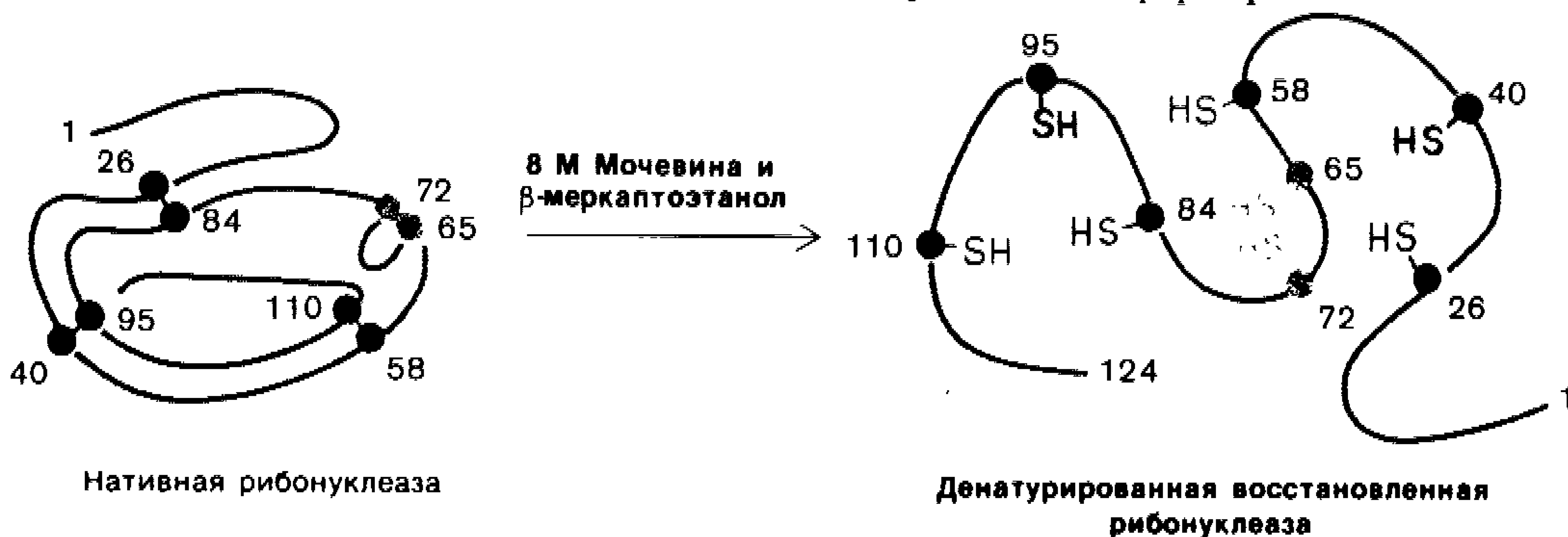


Рис. 2.45. Восстановление и денатурация рибонуклеазы.

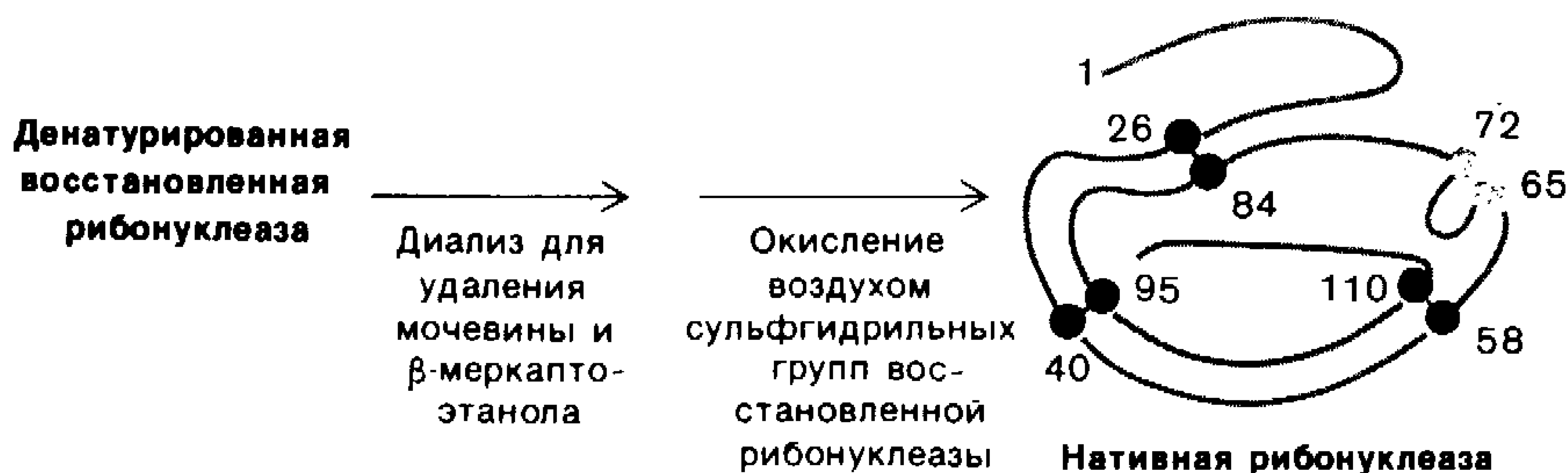


Рис. 2.46. Ренатурация рибонуклеазы.

цию фермента. *Таким образом, нативная форма рибонуклеазы является, по-видимому, термодинамически наиболее стабильной структурой.*

Анфинсен (1964) писал:

«Меня поразило, что на самом деле последовательность аминокислот в молекуле белка, который должен принять точно определенную геометрическую форму, следует рассматривать как мелодию, написанную в канонической форме; по предписанию Природы эта мелодия, накладываясь сама на себя, должна создать такие гармонические созвучия, которые соответствуют биологической функции. Продолжая аналогию дальше, можно предположить, что белки с «разболтанными» дисульфидными мостиками, о которых я говорил выше, дают диссонантные созвучия, однако если возникает возможность перестройки при добавлении меркаптоэтанола, то путем постепенной модуляции вновь достигается та приятная гармония, которая свойственна нативному белку. Можно ли на этом основании считать, что музыка Моцарта обладает большей термодинамической устойчивостью, чем музыка Шёнберга, я предоставляю решить философам этой аудитории».

2.13. Формирование свернутой молекулы белков происходит путем ассоциации α-спиралей и складчатых β-слоев

Как возникает гармония при превращении развернутой полипептидной цепи в свернутую молекулу белка? A priori одна из возможностей состоит в том, что происходит перебор всех возможных конформаций и выбирается энергетически наиболее выгодная форма. Сколько времени займет такой случайный поиск стабильной структуры? Рассмотрим для примера небольшой белок из 100 аминокислотных остатков.

Если каждый остаток может принять 3 разные конформации, то общее число возможных структур составит 3^{100}, или $5 \cdot 10^{47}$. Если превращение одной структуры в другую происходит за 10^{-13} с, то общее время поиска оптимальной конформации составит $5 \cdot 10^{47} \cdot 10^{-13}$ с, т.е. $5 \cdot 10^{34}$ с, или $1{,}6 \cdot 10^{27}$ лет! Отметьте, что это время минимально, поскольку истинное число возможных конформаций в расчете на один остаток аминокислоты выше трех, а время, необходимое для перехода одной конформации в другую,



Рис. 2.47. Образование нативной рибонуклеазы из «разболтанной» в присутствии следовых количеств β-меркаптоэтанола.

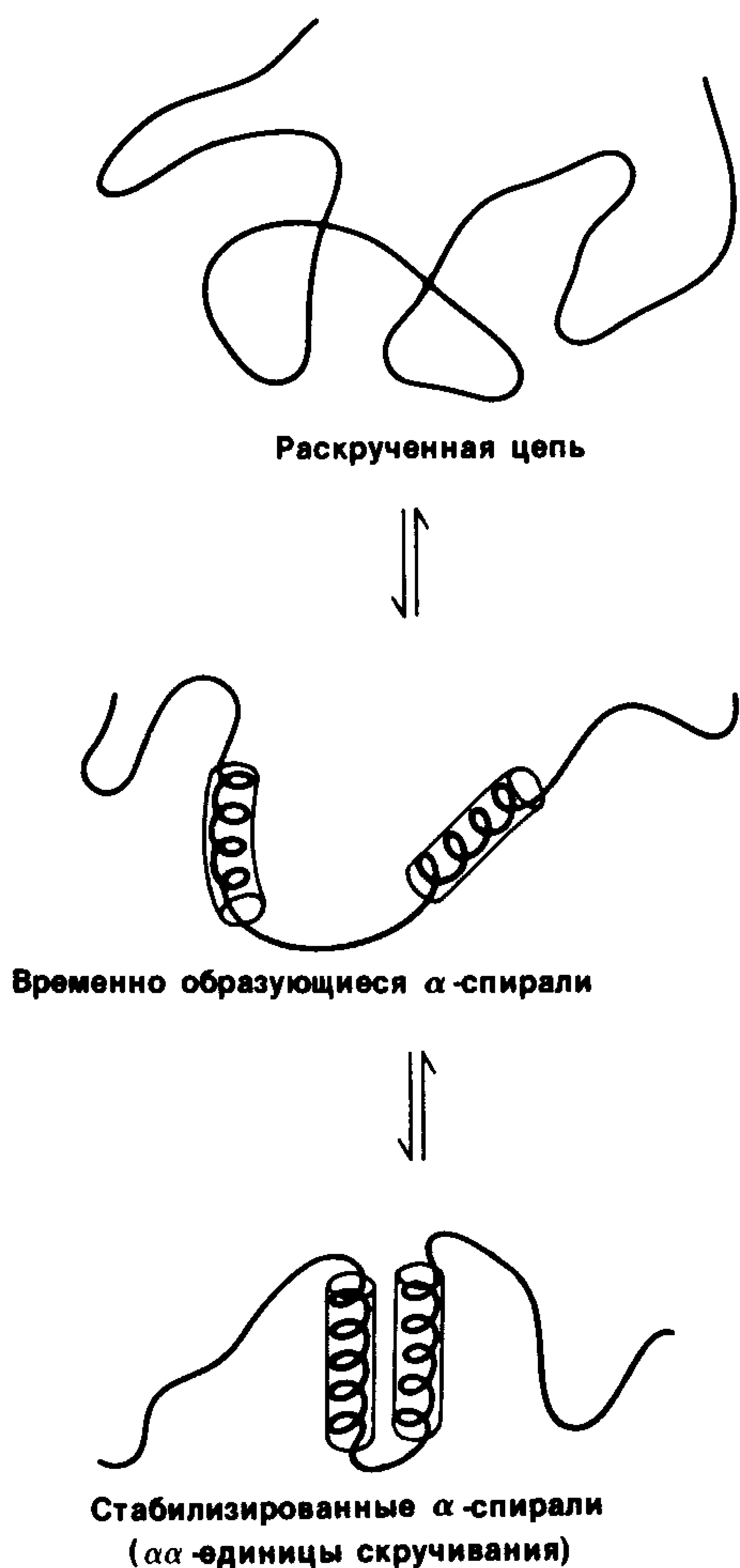


Рис. 2.48. Предполагаемые этапы скручивания белков. Два участка в развернутой полипептидной цепи на какой-то момент принимают структуру α-спирали. Далее происходит стабилизация обеих спиралей благодаря образованию комплекса между этими участками.

вероятно, превышает 10^{-13} с. Совершенно очевидно, что даже для небольшого белка время выбора энергетически оптимальной конформации путем случайного перебора всех возможных слишком велико.

Как же получается, что белки принимают нужную конформацию в течение нескольких секунд или минут? Ответ пока неизвестен, но высказана довольно убедительная гипотеза, что *важную роль в этом процессе играют небольшие участки вторичной структуры.* Согласно предложенной модели, короткие отрезки (~ 15 аминокислотных остатков) развернутой полипептидной цепи образуют короткоживущие структуры: α-спирали или β-слои. Эти промежуточные структуры сближаются в результате диффузии и стабилизируют друг друга путем формирования комплексов (рис. 2.48). Допустим, что произошло сближение двух α-спиралей, или двух β-слоев, или α-спирали и β-слоя. Образовавшиеся комплексы αα, ββ или αβ, которые называют *единицами скручивания*, играют далее роль центров, стабилизирующих другие выступающие элементы вторичной структуры. Эта модель имеет ряд экспериментальных доказательств. Прежде всего, способность полипептида к образованию правильной вторичной структуры в значительной степени зависит от аминокислотного состава. Так, остатки глутамата, метионина, аланина и лейцина способствуют образованию α-спиралей, тогда как остатки валина, изолейцина и тирозина усиливают образование β-слоев. Во-вторых, переход от случайного клубка к α-спирали происходит менее чем за одну микросекунду. Следовательно, короткие участки вторичной структуры могут формироваться очень быстро. В-третьих, постулированные единицы скручивания (комплексы αα, ββ и αβ) представляют собой по существу основные элементы структуры белка. Задача в настоящее время состоит в том, чтобы непосредственно выявить и идентифицировать короткоживущие промежуточные структуры, образующиеся при специфическом скручивании полипептидной цепи, и таким образом воссоздать тот путь, который приводит к формированию функционально активной структуры белка.

Заключение

Белки играют ключевую роль почти во всех биологических процессах. Все ферменты, катализаторы химических реакций в биологических системах, являются белками. Следовательно, белки определяют ход биологических превращений в клетках. Белки участвуют в осуществлении множества других функций,– таких, например, как транспорт веществ и их накопление, координированные движения, механическая опора, иммунологическая защита, возбудимость, регуляция роста и дифференцировка.

Основной структурной единицей белков

являются аминокислоты. Все белки всех видов живых существ – от бактерии до человека – содержат один и тот же набор из двадцати аминокислот. Боковые цепи аминокислот различаются по размеру, форме, заряду, способности образовывать водородные связи и химической реактивности. Их можно разделить на следующие группы: а) алифатические боковые цепи – глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин и пролин; б) гидроксилированные алифатические боковые цепи – серин и треонин; в) ароматические боковые цепи – фенилаланин, тирозин и триптофан; г) основные боковые цепи – лизин, аргинин и гистидин; д) кислые боковые цепи – аспарагиновая и глутаминовая кислоты; е) амидные боковые цепи – аспарагин и глутамин; ж) серусодержащие боковые цепи – цистеин и метионин.

Аминокислоты, в количестве обычно не менее ста, соединяются между собой пептидными связями, образуя полипептидную цепь. Пептидная связь соединяет α-карбоксильную группу одной аминокислоты с α-аминогруппой другой. В некоторых белках отдельные боковые цепи соединяются между собой дисульфидными мостиками, образующимися путем окисления остатков цистеина. Белки состоят из одной или нескольких полипептидных цепей. Каждый белок имеет уникальную последовательность аминокислот, которая детерминируется генетически. Определение последовательности аминокислот в белках проводят следующим образом. Сначала определяют общий аминокислотный состав, подвергая кислотный гидролизат белка хроматографии на ионообменнике, и проводят идентификацию N-концевого аминокислотного остатка с помощью реагента на концевую аминогруппу, например дансилхлорида. Следующий этап состоит в специфическом расщеплении белка на небольшие пептиды. Используют, в частности, трипсин, который гидролизует белки по пептидной связи, образованной карбоксильной группой остатков лизина и аргинина. Затем определяют последовательность аминокислот полученных пептидов по методу Эдмана, т.е. путем постепенного отщепления N-концевого остатка. Наконец, устанавливают последовательность пептидов в белке путем сопоставления последовательностей аминокислот в перекрывающихся пептидах.

Решающим фактором, определяющим биологическую функцию белков, является их конформация, т.е. расположение в пространстве атомов белковой молекулы. Известны три регулярно повторяющиеся конформации полипептидной цепи: α-спираль, складчатые β-слои и коллагеновая спираль. Короткие участки α-спирали и β-слоев встречаются во многих белках. Принципиально важен тот факт, что трехмерная структура белка определяется последовательностью аминокислот; впервые это было обнаружено при изучении рибонуклеазы. Было показано, что восстановленная, развернутая молекула рибонуклеазы способна к спонтанному восстановлению своей структуры (с образованием дисульфидных мостиков между цистеиновыми остатками в правильной комбинации) и полному восстановлению ферментативной активности, если удалить меркаптоэтанол и мочевину и денатурированный фермент подвергнуть окислению кислородом воздуха. Скручивание белков осуществляется путем ассоциации коротких полипептидных участков, образующих короткоживущую форму α-спирали или β-слоя.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Dickerson R.E., Geis I., forthcoming. Proteins: Structure, Function and Evolution, Benjamin. (Ясное и хорошо иллюстрированное общее описание белков.)

Moore S., Stein W.H., 1973. Chemical structures of pancreatic ribonuclease and deoxyribonuclease, Science, **180**, 458–464.

Anfinsen C.B., 1973. Principles that govern the folding of protein chains, Science, **181**, 223–230.

Книги по химии белков

Cantor C.R., Schimmel P.R., 1980. Biophysical Chemistry, Freeman. [Имеется перевод: Кантор Ч., Шиммел П. Биофизическая химия, т. 1–3.– М.: Мир, 1984.] (В гл. 2 и 5 т. 1 и гл. 20 и 21 т. 3 великолепно изложены вопросы конформации белков.)

Cooper T.G., 1977. The Tools of Biochemistry, Wiley. (Ценное руководство по методам белковой химии и другим аспектам биохимии. Четко описаны принципы методов.)

Neurath H., Hill R.L. (eds.), 1976. The Proteins (3rd ed.), Academic Press. (Многотомный трактат, содержащий много очень интересных статей.)

Haschemeyer R.H., Haschemeyer A.E.V., 1973. Proteins: A Guide to Study by Physical and Chemical Methods, Wiley-Interscience.

Hirs C.H.W., Timasheff S.N. (eds.), 1977. Enzyme Structure, Part E. Methods in Enzymology, vol. 47, Academic

Press. (Прекрасный сборник статей авторитетных специалистов, посвященный аминокислотному анализу, методам определения концевых групп, химического и ферментативного расщепления, разделения пептидов, анализа последовательности аминокислот, химической модификации и синтеза пептидов.)
Schultz G. E., Schirmer R. H., 1979. Principles of Protein Structure, Springer-Verlag.

Определение последовательности аминокислот

Konigsberg W. H., Steinman H. M., 1977. Strategy and methods of sequence analysis. In: Neurath H. and Hill R. L. (eds.), The Proteins (3rd ed.), vol. 3, pp. 1–178, Academic Press.
Niall H., 1977. Automated methods for sequence analysis. In: Neurath H. and Hill R. L. (eds.), The Proteins (3rd ed.), vol. 3, pp. 179–238, Academic Press.
Needleman S. B. (ed.), 1977. Advanced Methods in Protein Sequence Determination, Springer-Verlag.
Dayhoff M. O. (ed.), 1972. Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland. (Приведены все известные последовательности аминокислот в белках. Атлас переиздается каждые несколько лет.)

Ковалентная модификация белков

Uy R., Wold F., 1977. Post-translational covalent modification of proteins, Science, **198**, 890–896.
Hershko A., Fry M., 1975. Post-translational cleavage of polypeptide chains: role in assembly, Ann. Rev. Biochem., **44**, 775–797.
Glazer A. N., Delange R. J., Sigman D. S., 1975. Chemical Modification of Proteins, North-Holland.

Структура белков

Creighton T. E., Experimental studies of protein folding and unfolding, Prog. Biophys. Mol. Biol., **33**, 231–297.
Baldwin R. L., 1975. Intermediates in protein folding reactions and the mechanism of protein folding, Ann. Rev. Biochem., **44**, 453–475.
Chou P. Y., Fasman C. D., 1978. Empirical predictions of protein conformation, Ann. Rev. Biochem., **47**, 251–276.
Sternburg M. J. E., Thornton J. M., 1978. Prediction of protein structure from amino acid sequence, Nature, **271**, 15–20.
Karplus M., Weaver D. L., 1976. Protein-folding dynamics, Nature, **260**, 404–406.
Levitt M., Chothia C., 1976. Structural patterns in globular proteins, Nature, **261**, 552–558.
Chothia C., 1975. Structural invariants in protein folding, Nature, **254**, 304–308.
Anfinsen C. B., 1964. On the possibility of predicting tertiary structure from primary sequence. In: Sela M. (ed.), New Perspectives in Biology, pp. 42–50, American Elsevier.

Обзоры

Advances in Protein Chemistry.
Annual Review of Biochemistry.
Annual Review of Biophysics and Bioengineering.

ПРИЛОЖЕНИЕ. Понятия кислотности и основности

Ионизация воды

Вода диссоциирует на ион гидрония (H_3O^+) и гидроксильный ион (OH^-). Для простоты ион гидрония обозначим как ион водорода (H^+), и тогда процесс диссоциации воды в состоянии равновесия примет вид

$H_2O \rightleftarrows H^+ (OH^-$.

Константа равновесия K_p этого процесса составит

$$K_p = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}, \qquad (1)$$

где величины в квадратных скобках представлены в молярных концентрациях. Поскольку концентрация воды (55,5 М) при ионизации меняется мало, уравнение (1) можно упростить:

$$K_{H_2O} = [H^+][OH^-], \qquad (2)$$

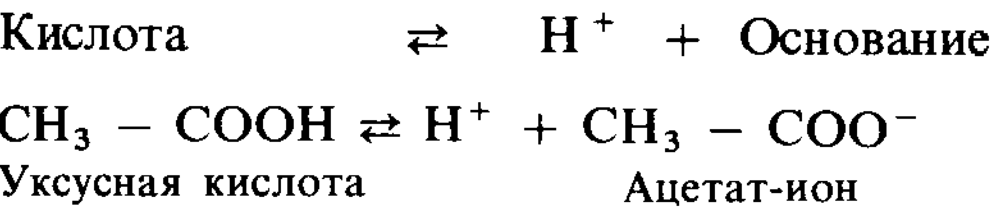
где K_{H_2O} – ионное произведение воды. При 25°C

$K_{H_2O} = 1{,}0 \cdot 10^{-14}$.

Следует обратить внимание на обратно пропорциональную зависимость между концентрациями ионов H^+ и OH^-. Если повышается концентрация H^+, то снижается концентрация OH^-, и наоборот. Например, если $[H^+] = 10^{-2}$ М, то $[OH^-] = 10^{-12}$ М.

Определение кислот и оснований

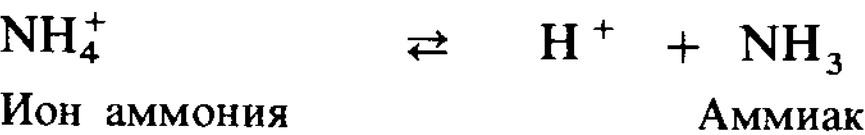
Кислота служит донором протона, основание – акцептором протона.



Кислота ⇄ H^+ + Основание

$CH_3 - COOH \rightleftarrows H^+ + CH_3 - COO^-$

Уксусная кислота Ацетат-ион



$NH_4^+ \rightleftarrows H^+ + NH_3$

Ион аммония Аммиак

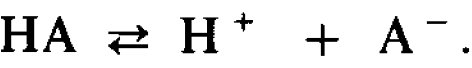
При ионизации кислоты образуется соответствующее ей (сопряженное) основание, и наоборот: при протонировании основания образуется соответствующая кислота. Так, уксусная кислота и ацетат-ион являются сопряженной парой кислота – основание.

Определение значений pH и p*K*

pH раствора является показателем концентрации в нем ионов водорода. Значение pH определяют, исходя из равенства

$$pH = \lg\frac{1}{[H^+]} = -\supset лу[H^+]. \qquad (3)$$

Представим процесс ионизации слабой кислоты в состоянии равновесия:



$HA \rightleftarrows H^+ + A^-$.

Кажущаяся константа равновесия K процесса ионизации выражается уравнением

$$K = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}. \qquad (4)$$

Отсюда pK кислоты можно определить как

$$pK = -\lg K = \lg\frac{1}{K}. \qquad (5)$$

Из уравнения (4) следует, *что pK кислоты представляет собой то значение pH, при котором кислота наполовину диссоциирована.*

Уравнение Хендерсона–Хассельбальха

Какова взаимосвязь между значением pH и соотношением кислоты и основания в растворе? Из уравнения (4) можно получить нужную формулу. Сделаем следующее преобразование:

$$\frac{1}{[H^+]} = \frac{1}{K}\cdot\frac{[A^-]}{[HA]}. \qquad (6)$$

Прологарифмируем это выражение:

$$\lg\frac{1}{[H^+]} = \lg\frac{1}{K} + \lg\frac{[A^-]}{[HA]}. \qquad (7)$$

Заменив $\lg 1/[H^+]$ и $\lg 1/K$ соответственно на pH и pK, получим

$$pH = pK + \lg\frac{[A^-]}{[HA]}. \qquad (8)$$

Последнее выражение широко известно как уравнение Хендерсона–Хассельбальха.

Из уравнения (8) можно вычислить значение pH раствора, если известны молеку-

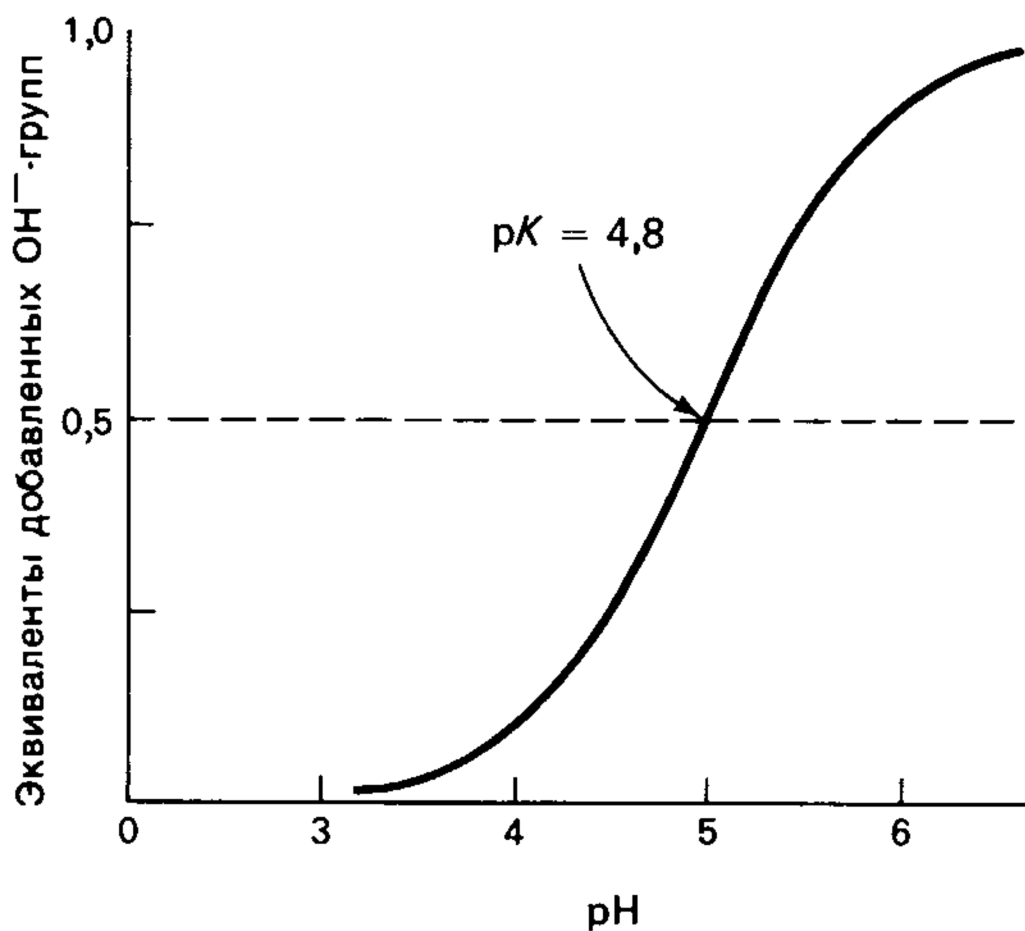


Рис. 2.49. Кривая титрования уксусной кислоты.

лярные соотношения A^- и HA, а также p*K* кислоты.

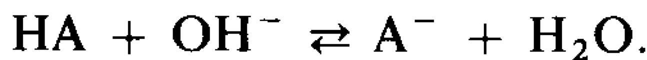
Допустим, что имеется раствор 0,1 М уксусной кислоты, содержащей 0,2 М ацетат-ионов. p*K* уксусной кислоты равно 4,8. Следовательно, pH раствора составит

$$pH = 4{,}8 + \lg\frac{0{,}2}{0{,}1} = 4{,}8 + \lg 2 = 4{,}8 + 0{,}3 = 5{,}1.$$

Аналогично можно рассчитать p*K* кислоты, если известны соотношение молярных концентраций A^- и HA и pH раствора.

Буферная емкость

Сопряженная пара кислота–основание (подобная приведенной паре уксусная кислота–ацетат-ион) обладает важным свойством: она препятствует изменению pH раствора. Другими словами, она является *буфером*. Представим себе, что к раствору уксусной кислоты (HA) добавляют OH^-:



$$HA + OH^- \rightleftarrows A^- + H_2O.$$

График зависимости pH такого раствора от количества добавленных ионов OH^- называют *кривой титрования* (рис. 2.49). Отметим, что кривая имеет точку перегиба при pH 4,8, соответствующую p*K* уксусной кислоты. Вблизи этого значения pH сравнительно большие количества добавленных OH^--ионов вызывают только незначительное изменение pH. В целом именно в области значений своего p*K* слабые кислоты проявляют наилучшие буферные свойства.

Таблица 2.3. **Величины p*K* некоторых аминокислот**

Аминокислота	p*K* (25°C)		
	α-COOH-группа	α-NH_3^+-группа	боковая цепь
Аланин	2,3	9,9	
Аргинин	1,8	9,0	12,5
Аспарагиновая кислота	2,0	10,0	3,9
Валин	2,3	9,6	
Гистидин	1,8	9,2	6,0
Глицин	2,4	9,8	
Глутаминовая кислота	2,2	9,7	4,3
Лизин	2,2	9,2	10,8
Серин	2,1	9,2	
Тирозин	2,2	9,1	10,9
Фенилаланин	1,8	9,1	
Цистеин	1,8	10,8	8,3

По J. T. Edsall, J. Wyman. Biophysical Chemistry, Academic Press, 1958, гл. 8.

Значения p*K* аминокислот

У аминокислот типа глицина могут ионизироваться две группы: α-карбоксильная группа и протонированная α-аминогруппа. Их можно оттитровать путем добавления основания (рис. 2.50). p*K* α-COOH-группы составляет 2,3, p*K* α-NH_3^+-группы – 9,6. Примерно такие же значения p*K* этих групп и у других аминокислот. У некоторых аминокислот, в частности у аспарагиновой кислоты, может ионизироваться также боковая цепь. Значения p*K* ионизирующихся боковых цепей аминокислот лежат в диапазоне от 3,9 (аспарагиновая кислота) до 12,5 (аргинин)

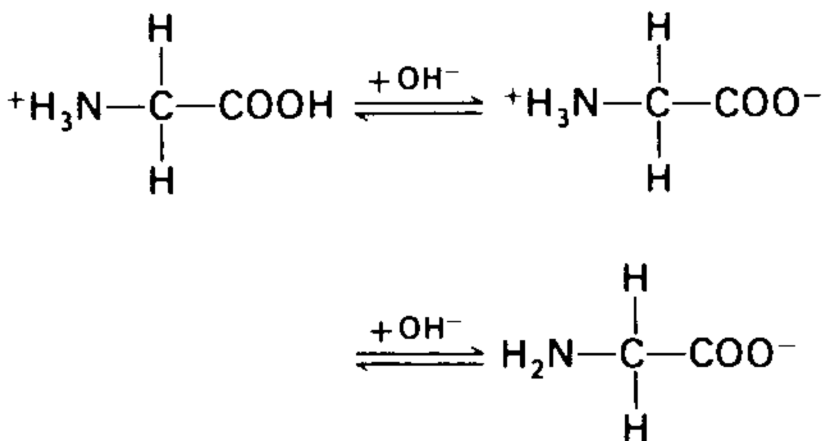


Рис. 2.50. Титрование ионизирующихся групп аминокислоты.

Вопросы и задачи

1. В химии белка часто используются следующие реактивы:

CNBr	Дансилхлорид
Мочевина	6 н. HCl
β-Меркаптоэтанол	Нингидрин
Трипсин	Фенилизотиоцианат
Надмуравьиная кислота	Химотрипсин

Какой из этих реактивов следует применить при решении следующих задач:

а) определение последовательности аминокислот в небольшом пептиде;

б) идентификация аминоконцевого остатка в пептиде (количество которого составляет менее 10^{-7} г);

в) обратимая денатурация белка, не содержащего дисульфидных связей. Какой понадобится дополнительный реактив, если в белке имеются дисульфидные связи?

г) гидролиз пептидных связей по карбоксильной группе ароматических аминокислотных остатков;

д) расщепление пептидных связей по карбоксильной группе метионинов;

е) гидролиз пептидных связей по карбоксильным группам остатков лизина и аргинина?

2. Какое значение pH следующих растворов:

а) 10^{-3} н. HCl;

б) 10^{-2} н. NaOH;

в) смеси равных объемов 0,1 М уксусной кислоты и 0,03 М уксуснокислого натрия;

г) смеси равных объемов 0,1 М глицина и 0,05 М NaOH;

д) смеси равных объемов 0,1 М глицина и 0,05 М HCl?

3. Каково соотношение основания и кислоты при pH 4, 5, 6, 7 и 8, если p*K* кислоты равно 6?

4. Мышечный белок тропомиозин представляет собой суперспираль состоящую из двух α-спирализованных тяжей. Масса этого белка - 70 кДа. Средняя масса одного аминокислотного остатка около 110 Да. Рассчитайте длину молекулы.

5. Для расщепления пептидных связей в белках используют безводный гидразин. Каковы продукты реакции? Как можно было бы воспользоваться этим методом для идентификации С-концевой аминокислоты?

6. Адренокортикотропный гормон человека представляет собой полипептид со следующей аминокислотной последовательностью: Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asp-Ala-Gly-Glu-Asp-Gln-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe.

а) Рассчитайте примерно общий заряд этой молекулы при pH 7, приняв, что значения p*K* боковых цепей аминокислот равны приведенным в табл. 2.3, и считая p*K* концевых $—NH_3^+$- и —COOH-групп равными соответственно 7,8 и 3,6.

б) Сколько получится пептидов при обработке гормона бромистым цианом?

7. Этиленимин реагирует с боковыми цепями цистеина в белке с образованием S-аминоэтильных производных. Пептидные связи, образованные карбоксильными группами этих модифицированных цистеиновых остатков, гидролизуются трипсином. Почему?

8. Выделен фермент, катализирующий обменные реакции между дисульфидными и сульфгидрильными группами. Неактивная «разболтанная» рибонуклеаза под действием этого фермента быстро превращается в каталлитически активную форму. С другой стороны, этот же фермент быстро инактивируется под действием инсулина. Какой вывод относительно взаимосвязи между последовательностью аминокислот в инсулине и его трехмерной структурой можно сделать на основании этого факта?

Дополнительные вопросы см.: Wood W. B., Wilson J. H., Benhow R. M., Hood L. E. Biochemistry: a Problem Approach, Benjamin, 1974, гл. 2, и Montgomery R. H., Swenson C. A. Quantitative Problems in the Biochemical Sciences, 2th ed., Freeman, 1976, гл. 6–8.

ГЛАВА 3.
Переносчики кислорода — миоглобин и гемоглобин

Переход от анаэробного существования к аэробному — важнейший этап эволюции, ибо он открыл богатейшие источники энергии. В присутствии кислорода из глюкозы можно получить в 18 раз больше энергии, чем в его отсутствие. В ходе эволюции у позвоночных выработались два основных механизма, обеспечивающих снабжение клеток постоянным и достаточным количеством кислорода. Первый — это система кровообращения, которая активно поставляет клеткам кислород. Если бы не было системы кровообращения, то размеры аэробных организмов не превышали бы миллиметра, поскольку диффузия кислорода на бóльшие расстояния оказалась бы слишком медленной и отставала бы от потребностей клеток. Второе важнейшее приспособление для снабжения клеток кислородом — это появление в процессе эволюции специальных *молекул — переносчиков кислорода*, позволившее преодолеть ограничения, накладываемые низкой растворимостью кислорода в воде. У позвоночных переносчиками кислорода служат белки *гемоглобин* и *миоглобин*. Гемоглобин, содержащийся в эритроцитах, выполняет функцию переносчика кислорода кровью. Наличие гемоглобина резко увеличивает способность крови переносить кислород — с 5 до 250 мл O_2 в расчете на один литр крови. Гемоглобин играет также жизненно важную роль в транспорте углекислого газа и ионов водорода. Миоглобин, находящийся в мышцах, выполняет функцию резервного источника кислорода и облегчает транспорт кислорода в мышцах.

3.1. Кислород присоединяется к простетической группе гема

Способность миоглобина и гемоглобина связывать кислород обусловлена наличием в них неполипептидного компонента, а именно гема. Гем определяет также красный цвет этих белков. Вообще очень многие белки содержат прочносвязанные специфические неполипептидные компоненты, необходимые для проявления биологической активности. Такие компоненты получили название *простетических групп*. Белок, лишенный своей простетической группы, называют *апопротеином*.

Гем состоит из органической части и атома железа. Органическая часть — *протопорфирин* — образована из четырех *пиррольных* групп. Четыре пиррола соединяются метиленовыми мостиками, образуя тетрапиррольное кольцо. К нему присоединены 4 метильные, 2 винильные и 2 пропионатные боковые цепи. Возможны 15 вариантов пространственного расположения этих замести-



Рис. 3.1. Изображение эритроцита, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Печатается с любезного разрешения д-ра M. Goldman и д-ра R. Leif.)

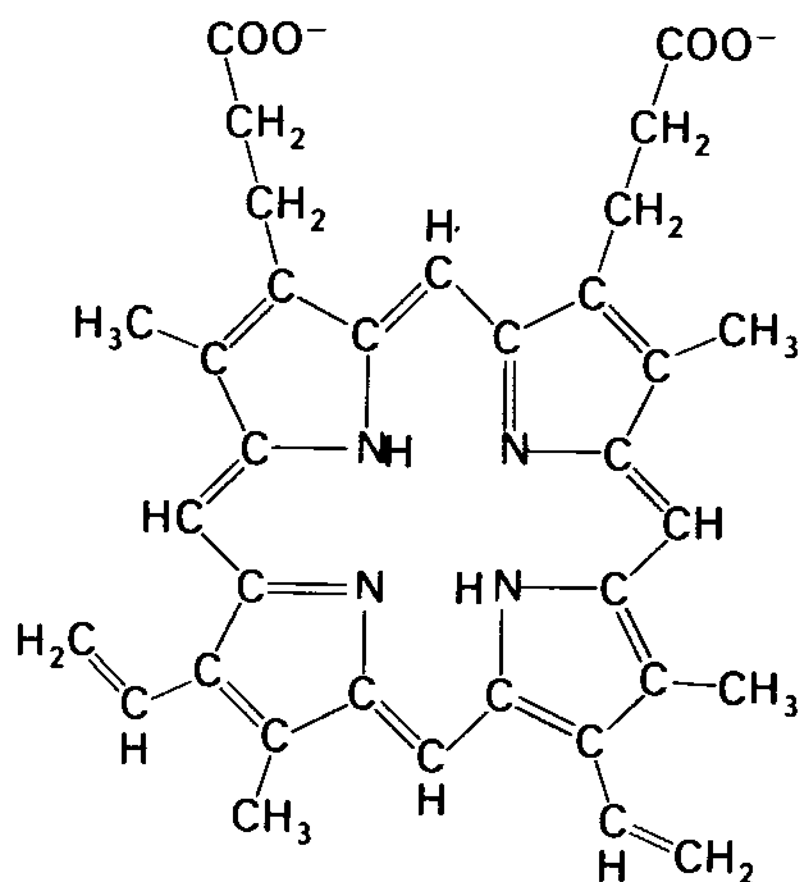


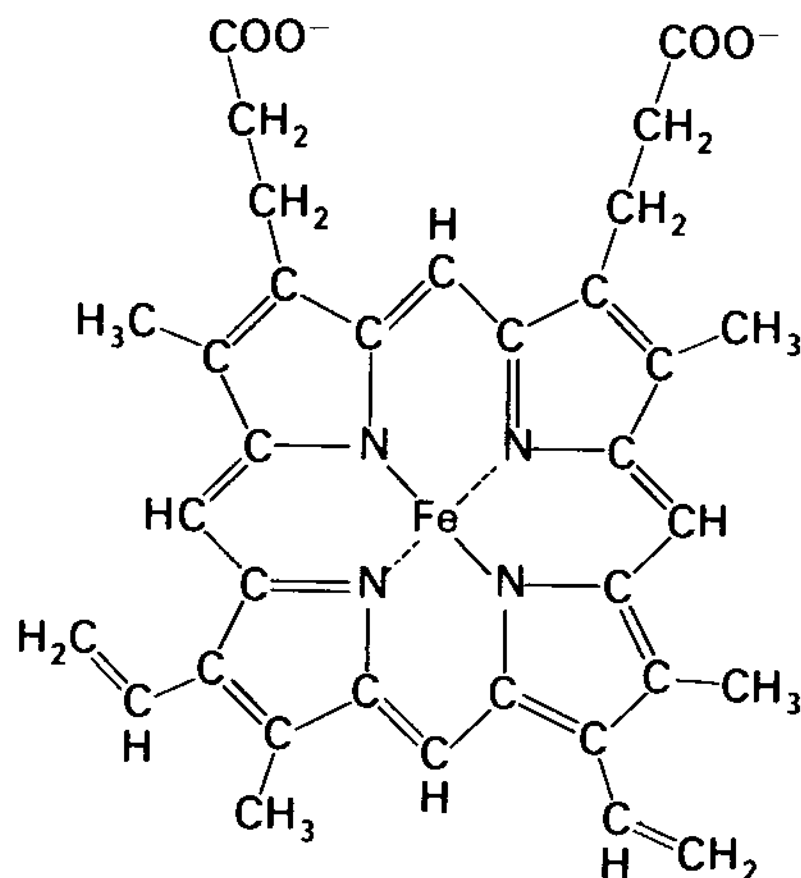
Изображение эритроцитов (двояковогнутой формы) и лейкоцитов (округлые) в мелком кровеносном сосуде, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Kessel R. G., Kardon R. H. Tissues and Organs, W. H. Freeman and Company, 1979.)

телей. В биологических системах присутствует только один из изомеров, называемый протопорфирин IX.

Атом железа в геме присоединен к 4 атомам азота в центре протопорфиринового кольца (рис. 3.2 и 3.3). Железо может давать еще дополнительные связи – по обе стороны плоскости гема. Эти направления связей обозначают как пятое или шестое координационные положения. Атом железа в геме может быть в ферроформе (+ 2) или ферриформе (+ 3). Соответствующие формы гемоглобина называют *феррогемоглобин* или *ферригемоглобин*. Ферригемоглобин называется также метгемоглобином. Только феррогемоглобин (+ 2) способен связывать кислород. Аналогичная номенклатура применима и к миоглобину.

4-665


Протопорфирин IX


Гем (Fe-протопорфирин IX)

3.2. Рентгеноструктурный анализ кристаллов выявляет пространственное расположение атомов

Выявление трехмерной структуры миоглобина Джоном Кендрью (J. Kendrew) и гемоглобина Максом Перутцом (M. Perutz) явилось выдающимся достижением молекулярной биологии. Эти исследования, успешно завершенные в конце 50-х годов, доказали применимость рентгеноструктурного анализа (рентгеноструктурной кристаллографии) для изучения структуры таких макромолекул, как белки. До 1957 г. самой большой из исследованных этим методом молекул был витамин B_{12}, молекулярная масса которого на порядок меньше молекулярной массы миоглобина (17,8 кДа) или гемоглобина (66 кДа). Определение пространственной структуры этих белков послужило огромным стимулом для развития белковой кристаллографии. Проводятся исследования по установлению пространственной структуры большого множества различных белков. Более чем для 50 белков пространственная структура к настоящему времени изучена уже детально. *Рентгеноструктурный анализ вносит большой вклад в наши представления о структуре и функции белков, потому что это единственный метод, выявляющий пространственное расположение большинства атомов в белке.* Ценным источником информации о структуре биологических макромолекул может служить также электронная микроскопия, однако пока еще она не позволяет выявить архитектуру молекулы на уровне атомов.

Прежде чем обратиться непосредственно к пространственной структуре миоглобина и гемоглобина, рассмотрим некоторые основные аспекты метода рентгеноструктурного анализа. Прежде всего анализируемый белок должен быть выделен в кристаллическом виде. Миоглобин, например, кристаллизуется при добавлении сульфата аммония к концентрированному раствору белка (рис. 3.4). В концентрации 3 М сульфат аммония значительно снижает растворимость миоглобина и тем самым приводит к его кристаллизации. Растворимость большин-

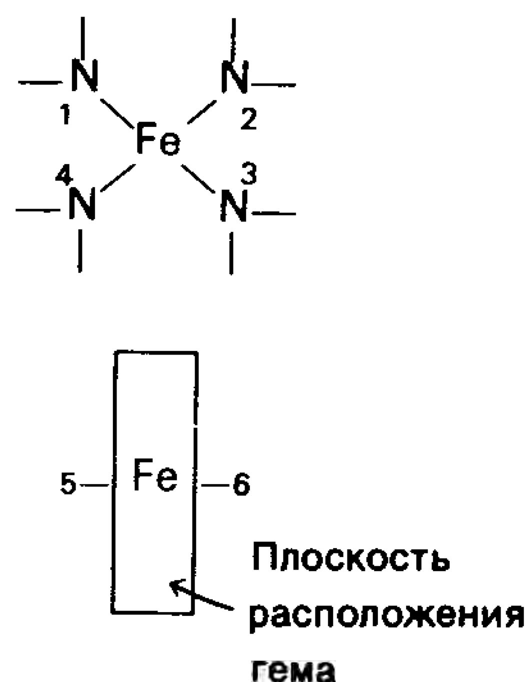


Рис. 3.2. Атом железа в геме способен образовывать шесть связей. Четыре из них расположены в плоскости гема. Пятая находится по одну сторону от этой плоскости, шестая – по другую. Расположение связанных с железом атомов называют также координационными положениями.

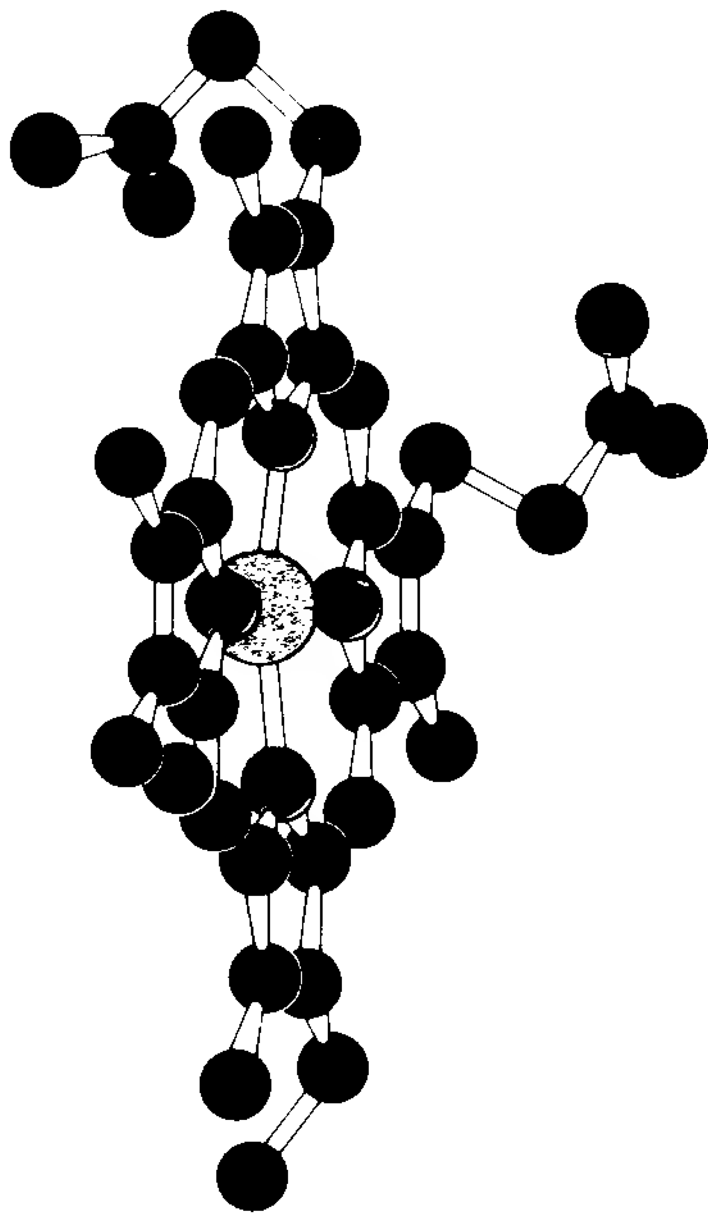


Рис. 3.3. Гем гемоглобина (желтым показано Fe, синим – N, красным – O, черным – C).

ства белков снижается при добавлении любых солей в высокой концентрации. Этот эффект называется *высаливанием*. Полученные таким образом кристаллы миоглобина (рис. 3.5) могут достигать нескольких миллиметров в длину.

Для проведения рентгеноструктурного анализа необходимы три компонента: *источник рентгеновских лучей*, *кристалл белка* и *детектор* (рис. 3.6). Рентгеновское излучение с длиной волны 1,54 Å получают путем бомбардировки медной мишени ускоренными электронами. Узкий пучок рентгеновских лучей направляется на кристалл белка. При этом часть пучка проходит через кристалл, не меняя своего направления, тогда как другая часть *рассеивается* в различных направлениях (*дифракция лучей*). Рассеянные пучки лучей попадают на фото пленку, причем степень потемнения эмульсии на пленке пропорциональна интенсивности падающих на нее лучей. В основе метода лежат следующие физические принципы:

1. Рентгеновские лучи рассеиваются электронами. Амплитуда волны, рассеиваемой атомом, пропорциональна числу электронов в атоме. Так, атом углерода рассеивает лучи в шесть раз сильнее, чем атом водорода.

2. Рассеянные волны взаимодействуют друг с другом (интерферируют). Каждый атом вносит свой вклад в отклонение каждого пучка лучей. Рассеянные волны могут усиливать или гасить друг друга в зависимости от того, совпадают они по фазе или нет.

3. Характер взаимодействия рассеянных волн целиком определяется расположением атомов в исследуемом веществе.

3.3. Этапы рентгеноструктурного анализа миоглобина

Кендрью выбрал миоглобин для проведения рентгеноструктурного анализа в силу многих причин: это относительно небольшой белок (17,8 кДа), его легко получить в больших количествах, и он легко кристаллизуется. Кроме того, миоглобин имеет и то достоинство, что он очень сходен с гемоглобином, исследованием которого уже занимался коллега Кендрью Перутц. В работе был использован миоглобин из скелетных мышц кашалота, отличающийся стабильностью и способностью великолепно кристаллизоваться. Скелетные мышцы ныряющих млекопитающих – китов, тюленей, дельфинов – особенно богаты миоглобином, который служит для резервирования кислорода, используемого во время ныряния.

Кристалл миоглобина помещают в капилляр и строго ориентируют по отноше-

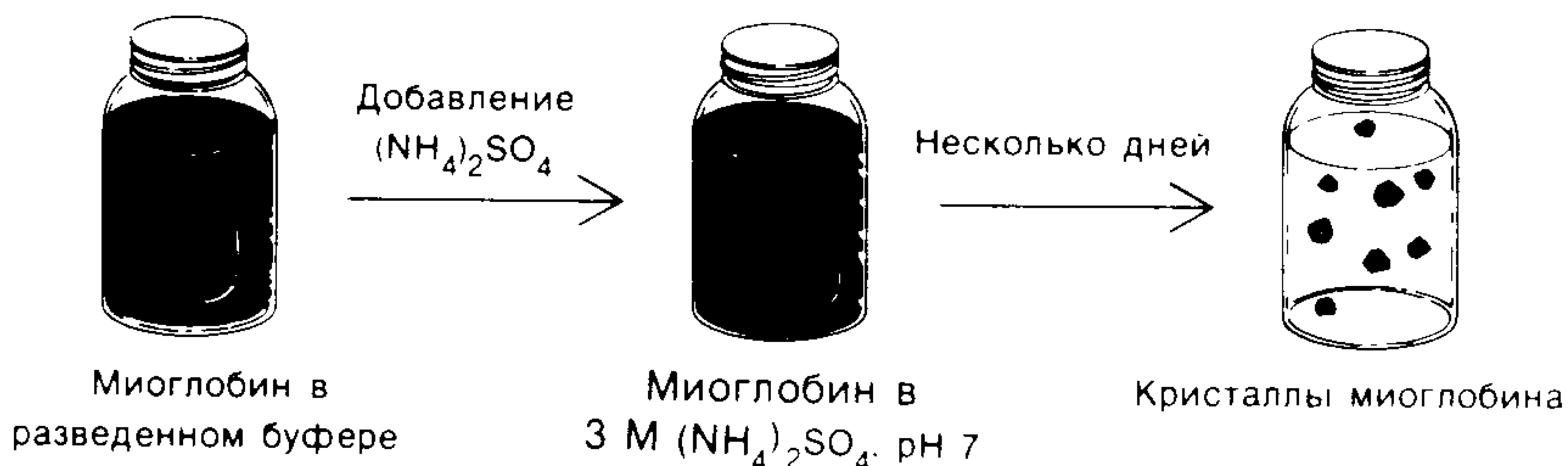


Рис. 3.4. Кристаллизация миоглобина.

нию к пучку рентгеновских лучей и к пленке. В результате прецессионного движения кристалла на рентгеновском фотоснимке образуется регулярная решетка пятен (рефлексов). Рентгеновская фотография, показанная на рис. 3.7, представляет собой двумерное сечение через трехмерное множество рефлексов. Кристалл миоглобина дает 25 000 рефлексов. Измеряют интенсивность каждого рефлекса. Получаемые величины представляют собой те исходные экспериментальные данные рентгеноструктурного анализа, которыми оперируют далее.

На следующем этапе воспроизводят структуру миоглобина, исходя из полученных значений интенсивности рефлексов: это производится с помощью математического метода представления сложных функций в виде гармонических рядов Фурье. Однако величины интенсивности рефлексов от кристаллов миоглобина дают только часть информации, необходимой для таких расчетов. Недостающие данные о фазах рассеянных пучков лучей получают из полной картины дифракции лучей кристаллом миоглобина, содержащего тяжелые атомы, например уран или свинец, по одну или две стороны молекулы. После этого переходят к расчету карты электронных плотностей, используя быстродействующие ЭВМ. По счастью, развитие кристаллографических исследований миоглобина совпало по времени с появлением быстродействующих ЭВМ с большим объемом памяти. Окончательный расчет по методу рядов Фурье

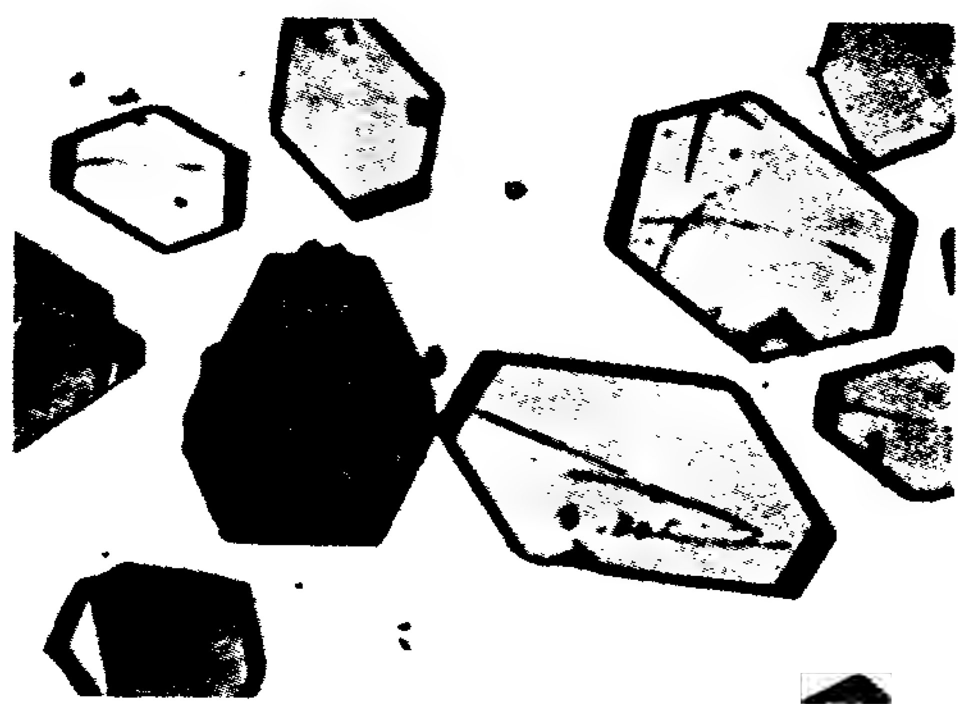


Рис. 3.5. Фотография кристаллов миоглобина. (Печатается с любезного разрешения д-ра J. Kendrew.)

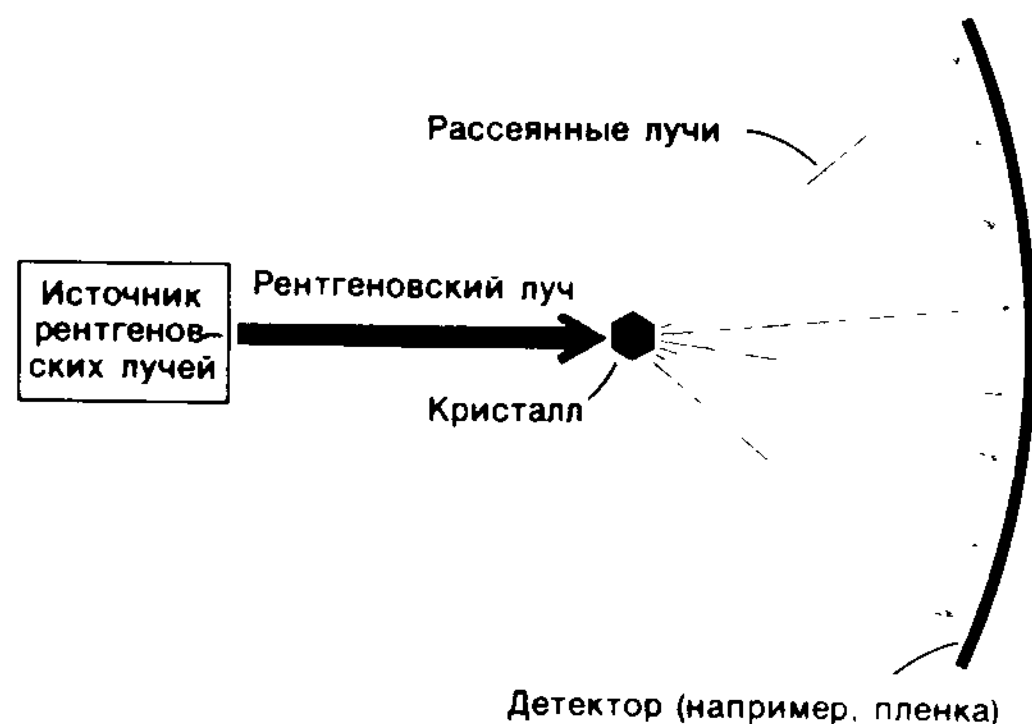


Рис. 3.6. Схема установки для проведения рентгеноструктурного анализа: рентгеновский луч, кристалл, детектор.

для миоглобина включал в себя около миллиарда величин.

В результате проведенной математической обработки получают величины электронной плотности в большом числе регулярно расположенных в пространстве точек кристалла. При этом трехмерное распределение электронных плотностей имеет вид серии наслоенных один над другим параллельных срезов. Каждый срез представляет собой прозрачную пластинку из синтетического материала, на которой распределение электронных плотностей показано контурными линиями (рис. 3.8). Такое изображение можно сравнить с картой рельефа земной поверхности, на которой контурными линиями обозначается высота местности над уровнем моря (рис. 3.9).

Следующий этап работы состоит в расшифровке карты электронных плотностей. Критическим фактором при этом выступает *разрешающая способность* метода рентгеноструктурного анализа, которая определяется количеством рефлексов, использованных в обратном преобразовании Фурье. Правильность изображения зависит от разрешающей способности обратного преобразования Фурье, как это показано с помощью оптической аналогии на рис. 3.10. Анализ миоглобина был выполнен в три этапа. На первом этапе, завершенном в 1957 г., анали-

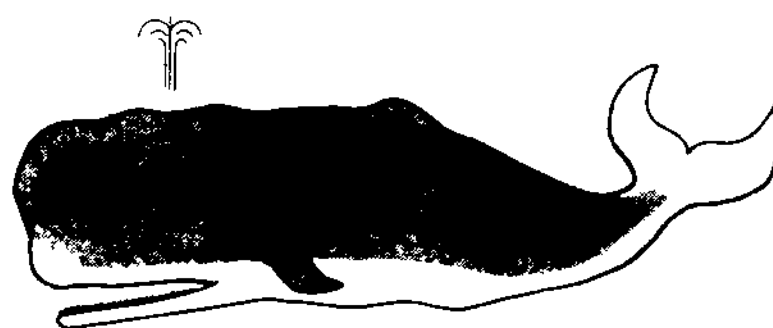




Рис. 3.7. Рентгенограмма кристалла миоглобина.

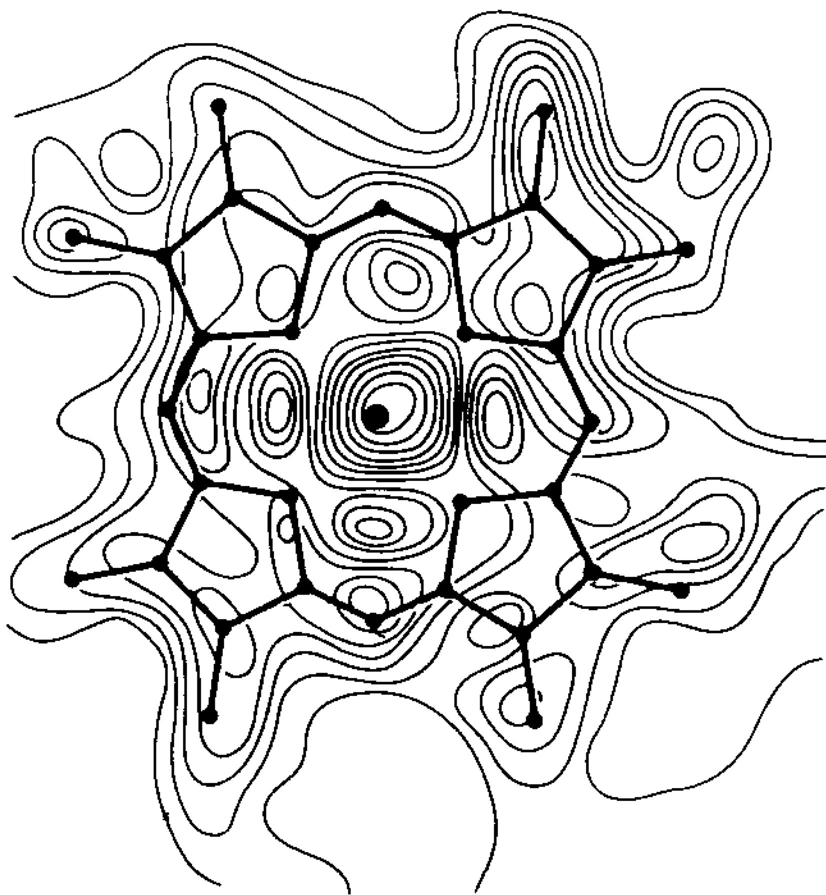


Рис. 3.8. Часть карты электронной плотности миоглобина: участок гема. Пик в центре соответствует положению атома железа. (Kendrew J.C., The thredimensional structure of a protein molecule, Scientific American, Inc., 1961.)

зу были подвергнуты только 400 внутренних рефлексов на дифракционной картине, что соответствовало разрешению 6 Å. Как будет показано несколько ниже, такая карта электронных плотностей низкого разрешения описывает полипептидную цепь, но выявляет мало других деталей структуры. Дело в том, что из-за особенностей укладки полипептидных цепей их центры расходятся на 5–10 Å. Чтобы выявить расположение групп атомов, отстоящих на 2,8–4,0 Å друг от друга, или отдельных атомов, разделенных расстоянием в 1,0–1,5 Å, требуются карты более высокого разрешения. В 1959 г. была получена карта миоглобина с разрешением 2 Å (10 000 рефлексов), а в 1962 г.–с разрешением 1,4 Å (25 000 рефлексов). Предел разрешающей способности рентгеноструктурного анализа определяется степенью совершенства структуры кристалла. Для белков этот предел обычно не ниже 2 Å.

В 1957 г. Кендрью и его сотрудники увидели то, чего до них никто не видел: пространственную структуру белковой молекулы во всей ее сложности. Модель, построенная на основании обратного преобразования Фурье с разрешением 6 Å, состояла из набора отрезков высокой плотности, имеющих именно те размеры, какие и приписывались полипептидной цепи (рис. 3.11). Молекула имела очень компактный вид. Более подробное изучение показало, что она состоит из сложной и переплетающейся сети этих отрезков, которые

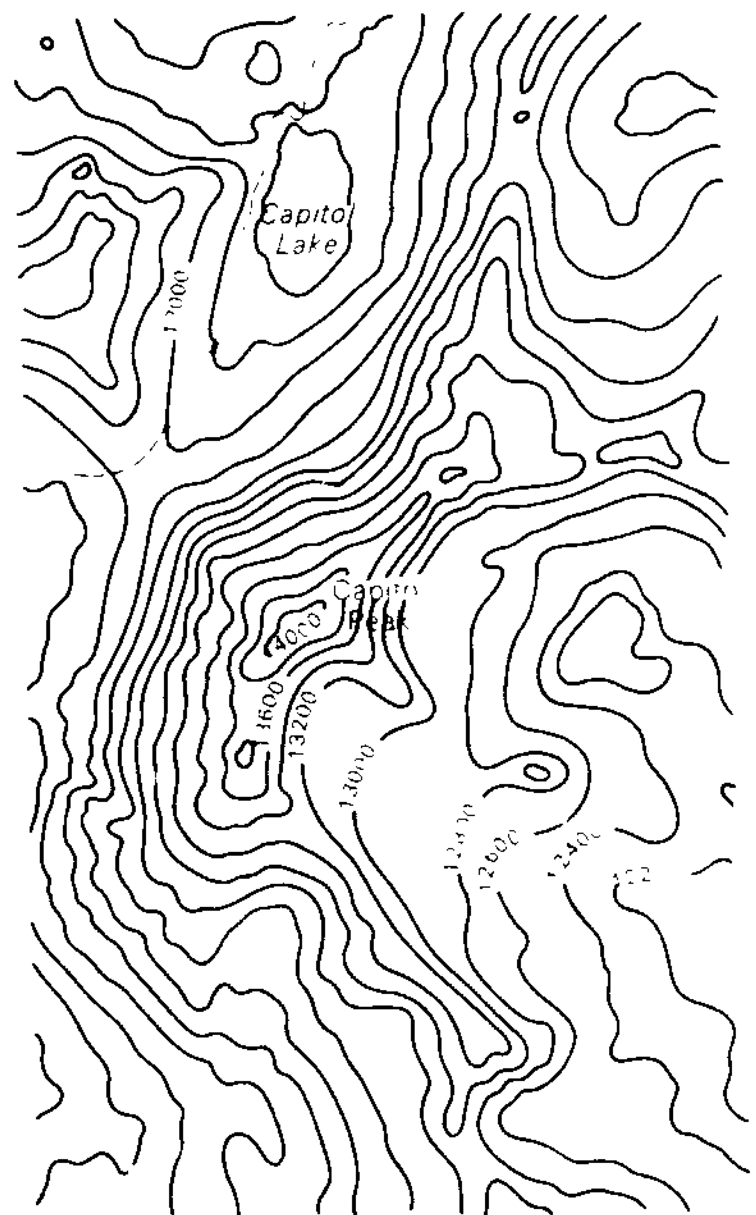
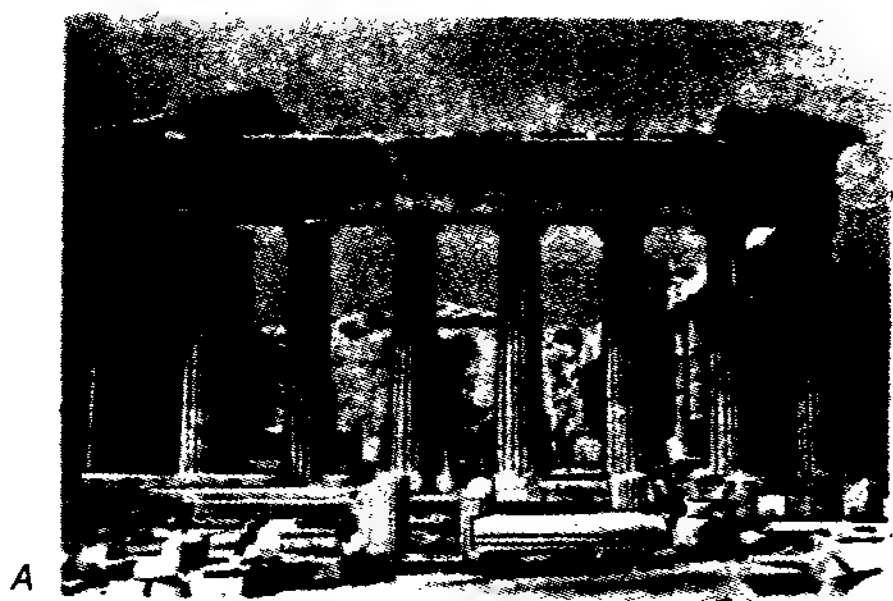


Рис. 3.9. Часть физической карты США; показан участок Капитол-пика, штат Колорадо.





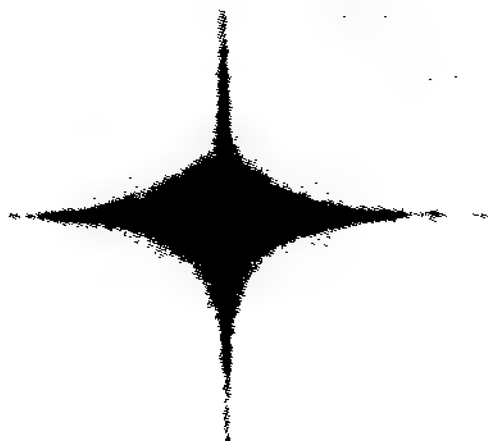




Рис. 3.10. Влияние разрешающей способности на качество реконструированного изображения. Для иллюстрации использован оптический аналог дифракции рентгеновских лучей. *А* – Парфенон, *Б* – картина дифракции от Парфенона, *В* и *Г* – изображения, полученные по данным, взятым из рис. *Б*. Для получения изображения, показанного на рис. *Г*, использовано больше точек, чем для получения изображения на рис. *В*. Соответственно изображение *Г* значительно выше качеством. [Печатается с любезного разрешения д-ра T. Steitz (*А*) и д-ра D. De Rosier (*Б*).]

то шли прямо на некотором протяжении, то делали угол, меняя направление. Расположение атома железа в геме было легко установить, так как железо содержит значительно больше электронов, чем любой другой атом в белке. Самое поразительное в структуре молекулы – это ее неправильность и полное отсутствие симметрии.

3.4. Структура миоглобина характеризуется компактностью и высокой степенью α-спирализованности

Полученная двумя годами позже карта электронных плотностей миоглобина с высоким разрешением содержала колоссаль-



Рис. 3.11. Модель миоглобина, полученная при низком разрешении. (Любезно предоставлена д-ром J. Kendrew.)

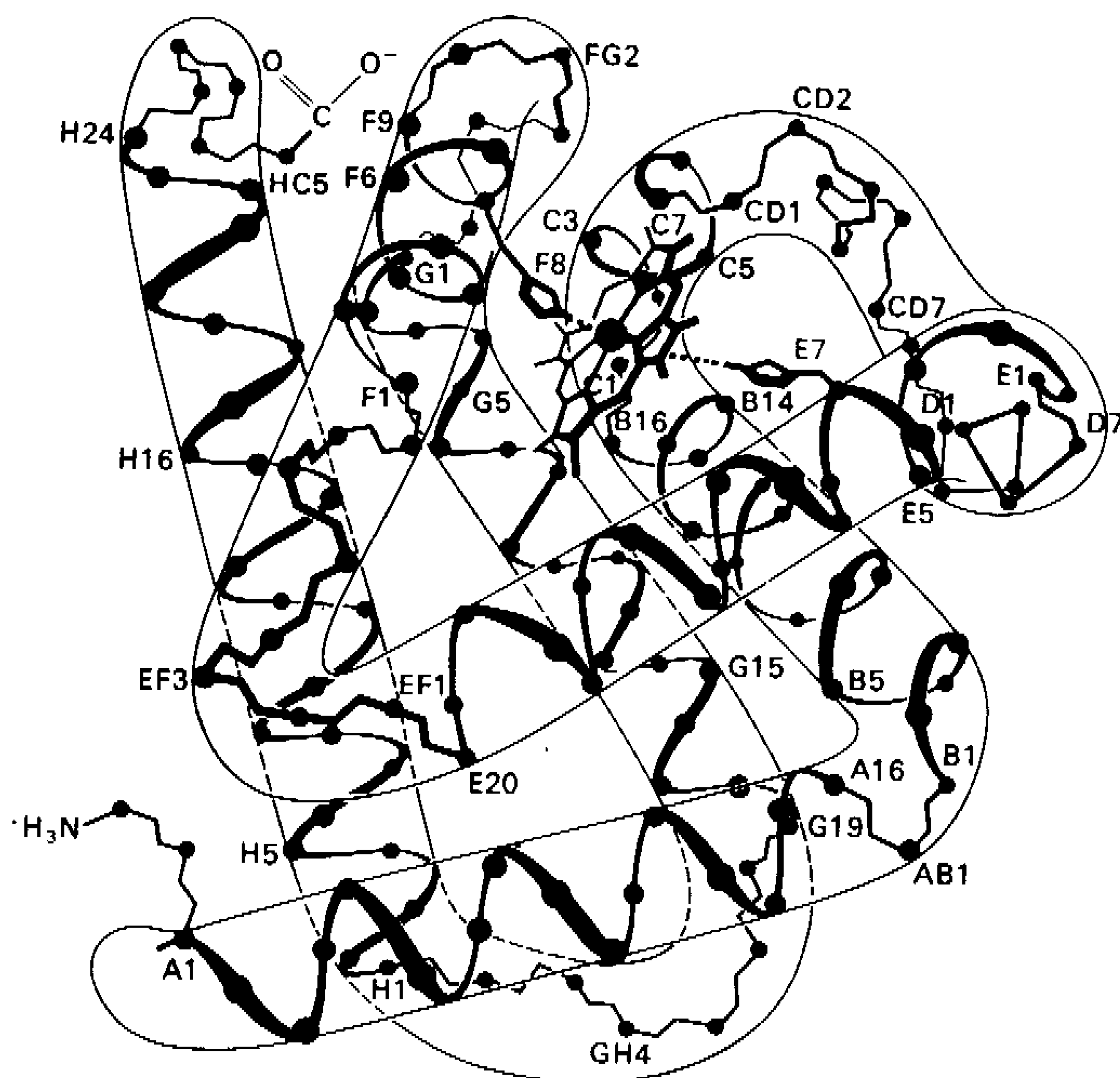


Рис. 3.12. Модель миоглобина, полученная при высоком разрешении. Показаны только α-углеродные атомы. Красным дан гем. (Dickerson R. E. In: The Proteins, H. Neurath, ed., 2th ed., v. 2, Academic Press, 1964, p. 634.)

ное количество информации относительно деталей структуры белка. Из 1260 атомов, т. е. всех атомов, кроме водорода, положение 120 атомов было определено с точностью, превышающей 0,3 Å. Общее расположение основной цепи и гема показано на рис. 3.12. Структура миоглобина имеет следующие особенности:

1. Молекула миоглобина *чрезвычайно компактна*. Ее объем равен 45 × 35 × 25 Å. Внутри молекулы почти нет свободного пространства.

2. Около 75% основной цепи находится в *конформации α-спирали*. Все α-спирали правозакрученные. Имеется 8 основных участков спирализации, которые обозначены первыми 8 буквами латинского алфавита: A, B, C, ..., H. Первый аминокислотный остаток в спирали A обозначают A1, второй A2 и т. д. (рис. 3.13). Между областями спирализации находится пять неспирализованных участков (обозначаемых, например, CD, если участок расположен между спиралями C и D). Имеются еще два неспирализованных участка: два аминокислотных остатка на N-конце молекулы (называемые NA1 и NA2) и пять остатков – на C-конце (обозначаются соответственно от HC1 до HC5).

3. Не все факторы, определяющие терминирование участка спирализации, уже выявлены. Известно, однако, что важную роль в этом процессе играют остатки пролина. *Пролин не может быть включенным в α-спираль* (разве только одним концом), потому что пятичленное пирролидоновое кольцо просто не может в ней уместиться. В миоглобине содержится четыре остатка пролина и восемь окончаний α-спиральных участков. Ясно, что имеются и другие факторы, определяющие завершение спирали. Так, например, в отдельных случаях происходит прерывание α-спирали, если OH-группа серина или треонина взаимодействует с карбонильной группой основной цепи.

4. Пептидные группы имеют *планарную* структуру. Карбонильная группа занимает *транс*-положение относительно NH-группы основной цепи. Длина связей и углы между ними соответствуют таковым в дипептидах и близких к ним соединениях.

5. Четко различаются внутренняя и наружная части молекулы. *Внутренняя часть молекулы почти целиком состоит из неполярных остатков* лейцина, валина, метионина, фенилаланина и не содержит боковых

Val-Leu-Ser-Glu-Gly-Glu-Trp-Gln-Leu-Val-
NA1 NA2 A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 10

Leu-His-Val-Trp-Ala-Lys-Val-Glu-Ala-Asp-
A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16 AB1 B1 20

Val-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Asp-Ile-Leu-Ile-
B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 30

Arg-Leu-Phe-Lys-Ser-His-Pro-Glu-Thr-Leu-
B12 B13 B14 B15 B16 C1 C2 C3 C4 C5 40

Glu-Lys-Phe-Asp-Arg-Phe-Lys-His-Leu-Lys-
C6 C7 CD1 CD2 CD3 CD4 CD5 CD6 CD7 CD8 50

Thr-Glu-Ala-Glu-Met-Lys-Ala-Ser-Glu-Asp-
D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 E1 E2 E3 60

Leu-Lys-Lys-His-Gly-Val-Thr-Val-Leu-Thr-
E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11 E12 E13 70

Ala-Leu-Gly-Ala-Ile-Leu-Lys-Lys-Lys-Gly-
E14 E15 E16 E17 E18 E19 E20 EF1 EF2 EF3 80

His-His-Glu-Ala-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Ala-
EF4 EF5 EF6 EF7 EF8 F1 F2 F3 F4 F5 90

Gln-Ser-His-Ala-Thr-Lys-His-Lys-Ile-Pro-
F6 F7 F8 F9 FG1 FG2 FG3 FG4 FG5 G1 100

Ile-Lys-Tyr-Leu-Glu-Phe-Ile-Ser-Glu-Ala-
G2 G3 G4* G5 G6 G7 G8 G9 G10 G11 110

Ile-Ile-His-Val-Leu-His-Ser-Arg-His-Pro-
G12 G13 G14 G15 G16 G17 G18 G19 GH1 GH2 120

Gly-Asn-Phe-Gly-Ala-Asp-Ala-Gln-Gly-Ala-
GH3 GH4 GH5 GH6 H1 H2 H3 H4 H5 H6 130

Met-Asn-Lys-Ala-Leu-Glu-Leu-Phe-Arg-Lys-
H7 H8 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16 140

Asp-Ile-Ala-Ala-Lys-Tyr-Lys-Glu-Leu-Gly-
H17 H18 H19 H20 H21 H22 H23 H24 HC1 HC2 150

Tyr-Gln-Gly
HC3 HC4 HC5 153

Рис. 3.13. Аминокислотная последовательность миоглобина кашалота. Цифры и буквы под каждым остатком указывают на его положение в α-спиралях или в неспирализованных участках между ними. Например, B4 обозначает четвертый остаток в спирали B; EF7 – 7-й остаток в неспирализованном участке между спиралями E и F. [Edmundson A. E., Nature, **205**, 883 (1965); Watson H. C., Prog. Stereochem., **4**, 299–333 (1969).]

Снаружи
Снаружи
Снаружи
Треонин **Тирозин** **Триптофан**

цепей глутаминовой и аспарагиновой кислот, глутамина, аспарагина, лизина или аргинина. Аминокислотные остатки, имеющие полярную и неполярную части, а именно треонин, тирозин и триптофан ориентированы так, что внутрь обращены их неполярные участки. Есть только два полярных остатка внутри молекулы миоглобина – это два гистидина, расположенные в активном центре и играющие главную роль в функциональной активности. На наружной стороне молекулы расположены как полярные, так и неполярные аминокислотные остатки.

3.5. Участок связывания кислорода в миоглобине

Группа гема локализуется в углублении на молекуле миоглобина. Высокополярные пропионатные боковые цепи гема расположены на поверхности молекулы. При физио-

Гистидин F8
Fe O_2
Гистидин E7
Плоскость расположения гема

Рис. 3.14. Схематическое изображение участка связывания кислорода в миоглобине. Пятое координационное положение занято гистидином F8 (проксимальный гистидин); кислород связывается в шестом координационном положении; гистидин E7 (дистальный гистидин) расположен вблизи шестого координационного положения.

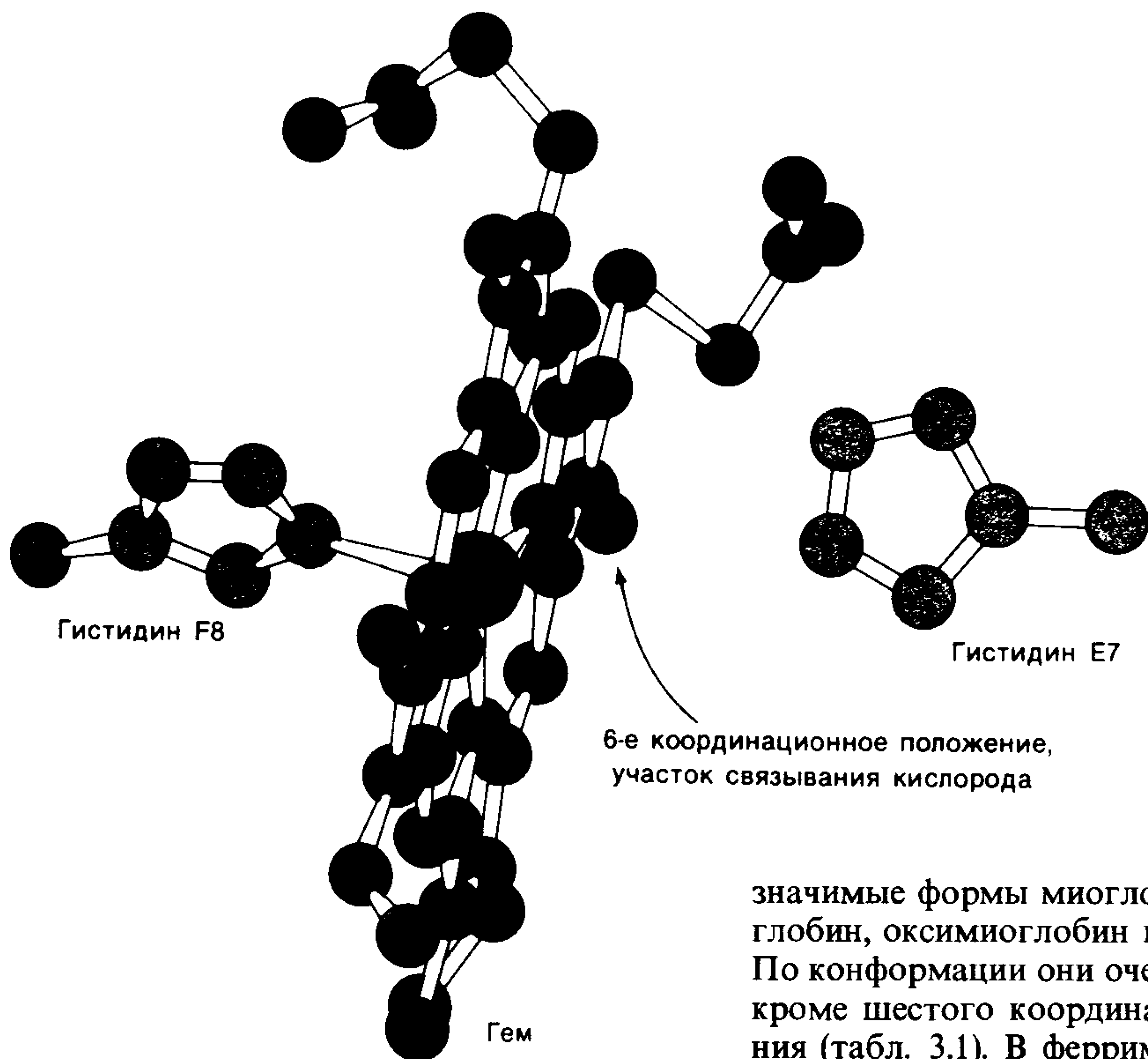


Рис. 3.15. Модель участка связывания кислорода в миоглобине. Показаны гем, проксимальный гистидин (F8) и дистальный гистидин (E7).

логическом значении pH они находятся в ионизированном состоянии. Остальные части гема погружены внутрь молекулы миоглобина, где ее окружают неполярные, за исключением двух гистидинов, аминокислотные остатки. Атом железа в геме присоединен непосредственно к одному из этих гистидинов, а именно к остатку F8 (рис. 3.14 и 3.15). Этот остаток, занимающий пятое координационное положение, называется проксимальным гистидином. Атом железа примерно на 0,3 Å выступает над плоскостью порфирина на стороне гистидина-F8. *Участок связывания кислорода расположен по другую сторону плоскости в шестом координационном положении.* Рядом располагается второй остаток гистидина (E7), называемый дистальным. Остаток дистального гистидина-E7 с гемом не связан. На рис. 3.16 показан участок карты электронных плотностей, включающий область гема.

Были исследованы три физиологически значимые формы миоглобина: дезоксимиоглобин, оксимиоглобин и ферримиоглобин. По конформации они очень сходны во всем, кроме шестого координационного положения (табл. 3.1). В ферримиоглобине в этом положении стоит вода; в дезоксимиоглобине оно свободно; в оксимиоглобине это положение занято кислородом. Связь с O_2 находится под углом к связи железо–кислород (рис. 3.17). Атом железа при оксигенировании пододвигается к плоскости гема примерно на 0,2 Å. Важно отметить, что гем, таким образом, не является жесткой структурой. Более того, перемещение атома железа при оксигенировании играет ключевую роль в функционировании гемоглобина, что будет показано в следующей главе (разд. 4.11).

В контакт с гемом входят аминокис-

Таблица 3.1. **Окружение гема**

Форма	Чем занято		
	Валентность железа	5-координационное положение	6-е координационное положение
Дезоксимиоглобин	+ 2	His F8	Свободно
Оксимиоглобин	+ 2	His F8	O_2
Ферримиоглобин	+ 3	His F8	H_2O



Рис. 3.16. Фрагмент карты электронной плотности миоглобина вблизи участка связывания кислорода. Электронноплотная область, тянущаяся вдоль нижней части карты,– спираль E. (Печатается с любезного разрешения д-ра J. Kendrew.)

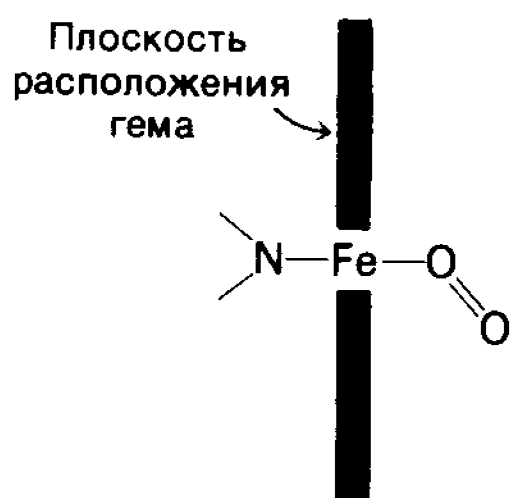


Рис. 3.17. Наклон и ориентация связи кислорода с атомом железа в оксимиоглобине. Угол между осью O_2 и связью Fe—O составляет 121°.

лотные остатки, принадлежащие разным участкам линейной последовательности, в частности остатки C4 и H14, соответствующие аминокислотам 39 и 138 линейной последовательности. Отсюда видно, что *участок, связывающий гем, в своей значительной части имеет трехмерную структуру.*

3.6. Жесткое окружение гема обеспечивает обратимость оксигенирования

На долю участка, в котором происходит связывание кислорода, приходится лишь небольшая часть объема всей молекулы миоглобина. В самом деле, кислород непосредственно присоединяется только к атому железа в геме. Какова же роль полипептидной части молекулы в связывании и переносе кислорода? Для ответа на этот вопрос рассмотрим, как связывается кислород свободным гемом. В водном растворе свободный феррогем способен связать кислород, но лишь на короткий момент. Объясняется это тем, что в воде феррогем быстро окисляется до ферригема, который не связывает кислорода. Промежуточным продуктом в этой реакции является сандвичевое соединение, образованное двумя гемами с O_2

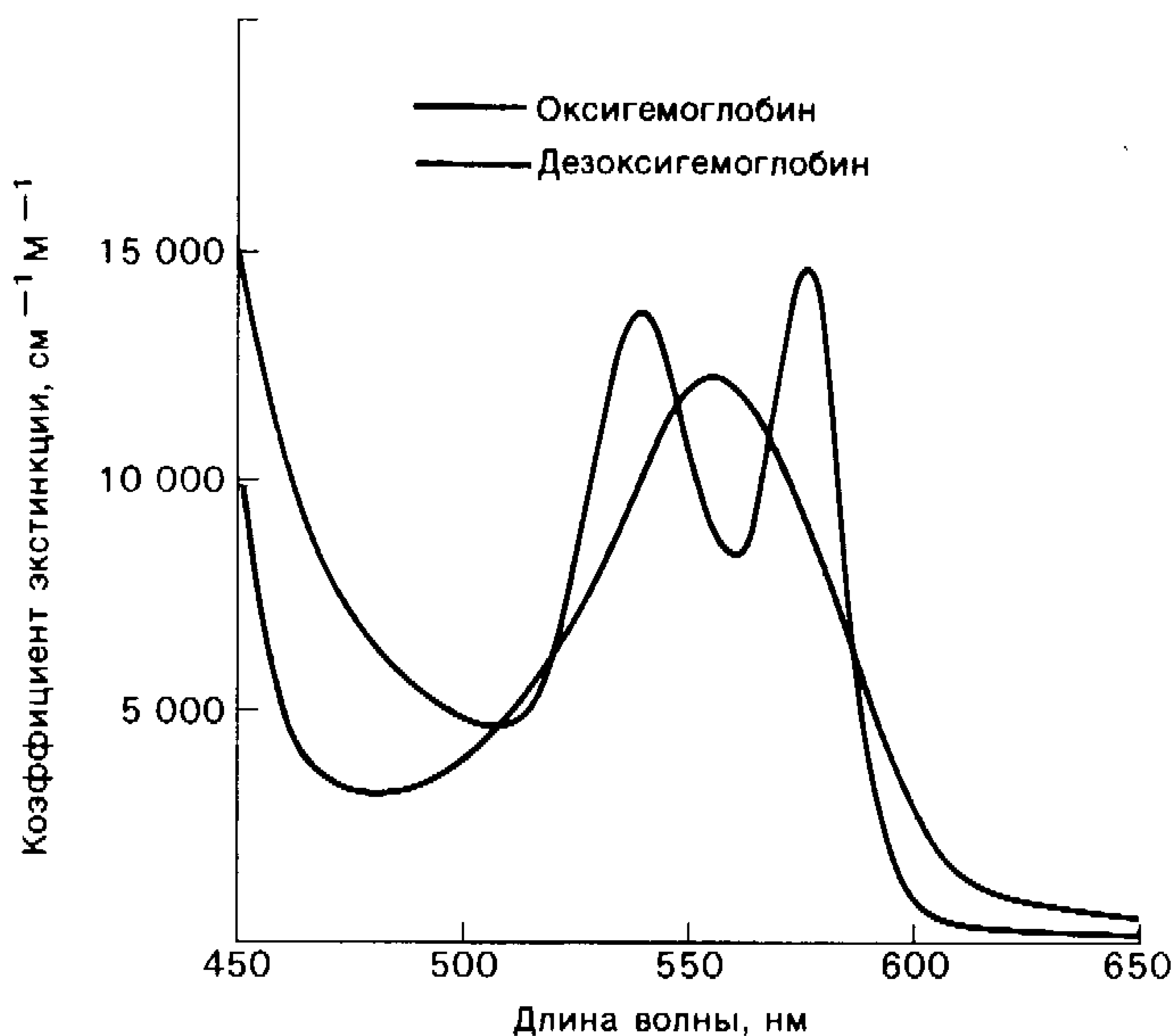


Рис. 3.18. При связывании кислорода изменяются спектры поглощения миоглобина и гемоглобина в области видимого света. Миоглобин и гемоглобин имеют очень сходные спектры поглощения видимого света.

между ними. *В миоглобине гем менее чувствителен к окислению, поскольку две молекулы миоглобина практически не способны к ассоциации и образованию сандвичевого соединения гем – O_2 – гем.* Образование такого комплекса стерически заблокировано дистальным гистидином и другими остатками, окружающими шестое координационное положение. Самые убедительные данные в пользу того, что стерические факторы определяют скорость окисления гема, были получены при изучении специально синтезированных модельных соединений. Джеймс Коллман (J. Collman) синтезировал *железопорфириновые комплексы, огороженные «частоколом» заместителей* (рис. 3.19), имитирующие участки связывания кислорода в миоглобине и гемоглобине. В этих соединениях на одной стороне порфиринового кольца имелась «огороженная» область для связывания O_2, тогда как другая сторона оставалась незакрытой и могла связывать основание. Оказалось, что если в качестве основания присоединялся замещенный имидазол, этот комплекс (рис. 3.20) приобретал такое же сродство к кислороду, как и миоглобин. Более того, «огороженность» стабилизирует ферроформу этого железопорфирина, в результате чего он приобретает способность к обратимому связыванию кислорода на длительное время. Основное различие между этим модельным соединением и обычным гемом состоит в наличие заместителей, создающих «огороженную» структуру, и тем самым блокирующих образование димерного сандвича гем – O_2 – гем.

Следовательно, в миоглобине создается такое микроокружение простетической группы, благодаря которому она приобре-

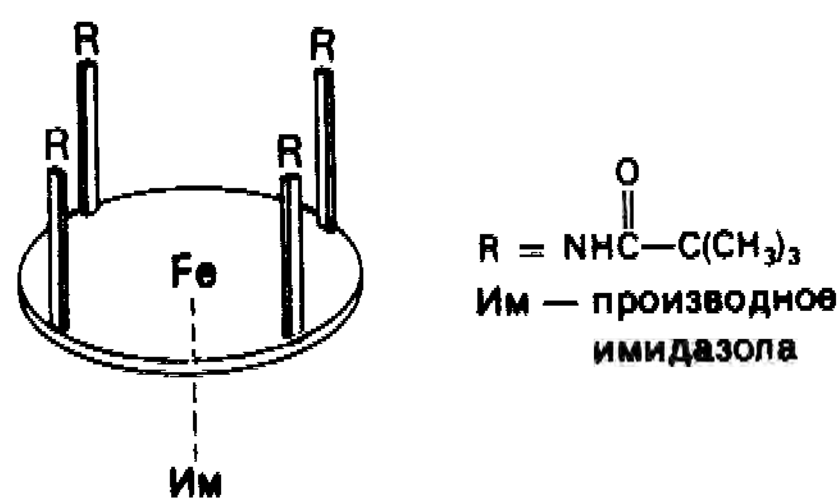


Рис. 3.19. Схематическое изображение «огороженного» железопорфирина со связанным O_2. «Частокол» химических заместителей препятствует сближению двух порфиринов и образованию промежуточного продукта окисления.

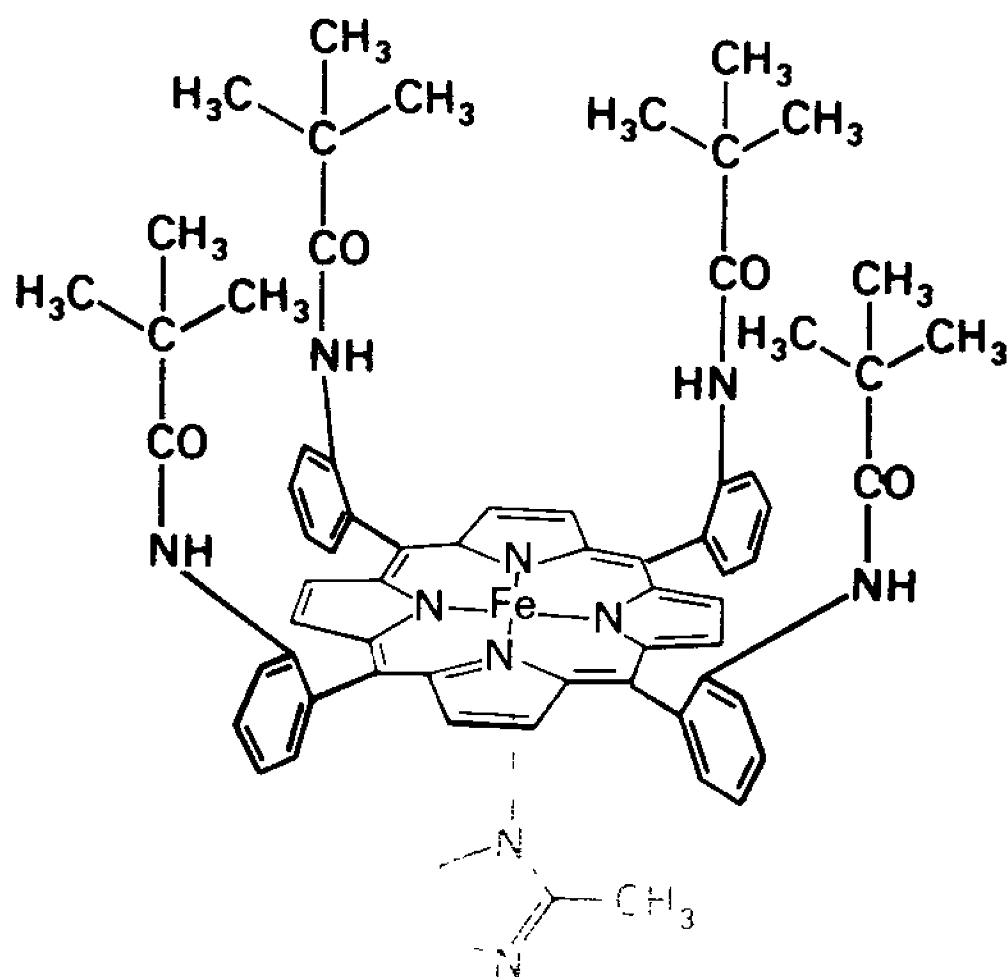


Рис. 3.20. Структурная формула «огороженного» железопорфирина. [Collman J., Brauman J.I., Rose E., Suslick K.S., Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 1053 (1978).]

тает характерные свойства. Это общее правило, что *функция простетической группы частично зависит от ее полипептидного окружения.* В самом деле, тот же самый гем выполняет совершенно другую функцию в составе цитохрома *c*-белка конечного участка дыхательной цепи в митохондриях всех аэробных организмов. В цитохроме *c* гем обратимо переносит электроны, а не кислород. Наконец, совсем другую роль играет гем, входящий в состав фермента каталазы, где он разлагает перекись водорода на воду и кислород.

3.7. Присутствие дистального гистидина снижает связывание оксида углерода

Оксид углерода ядовит, так как, присоединяясь к ферромиоглобину или феррогемоглобину, он препятствует транспорту кислорода в организме. Гему свойственно высокое сродство к CO. В водном растворе связывание CO свободным гемом происходит примерно в 25 000 раз сильнее, чем связывание O_2. Однако в составе гемоглобина или миоглобина сродство гема к CO превышает сродство к O_2 только примерно в 200 раз. Каким же образом эти белки подавляют природное предпочтение гемом оксида углерода? Ответ был получен при рентгеноструктурном анализе и инфракрасной спектроскопии комплексов CO и O_2 с миоглобином и модельными железопорфиринами. Железопорфирины обладают очень высокой степенью сродства к CO; в их комплексах с CO атомы Fe, C и O расположены на одной прямой (рис. 3.21). В комплексе же миоглобина с CO ось CO находится под углом к связи Fe—C. Расположению CO на одной прямой со связью Fe—C препятствует главным образом наличие дистального гистидина. С другой стороны, ось O_2 находится под углом к связи Fe—O как в оксимиоглобине, так и в модельных соединениях. *Следовательно, под влиянием белка CO координируется с железом под углом к связи Fe—C, а не на одной прямой с ней. Такая наклонная геометрия, обусловленная глобином, ослабляет взаимодействие гема с CO и в то же время создает оптимальные условия для связывания O_2.*

Пониженное сродство миоглобина и гемоглобина к CO имеет очень важное значение для биологических процессов. Оксид углерода представлял потенциальную опасность еще задолго до развития индустриализации. Дело в том, что CO образуется эндогенно при расщеплении гема (разд. 21.16). Таким образом, генерирование оксида углерода в организме неразрывно связано с использованием им гема. Эндогенно образуется такое количество CO, которое блокирует ~1% участков связывания кислорода в миоглобине и гемоглобине. Разумеется, такой уровень торможения невелик. Однако если бы относительное сродство этих белков к CO было примерно таким, какое характеризует свободные железопорфирины, то эндогенно образованный оксид углерода вызывал бы серьезное отравление. Природа решила вопрос таким образом, что в ходе эволюции появились гемосодержащие белки, которые в силу стерических факторов ослабляют связывание гемом CO, но не O_2.

3.8. В растворенном виде и в кристаллическом состоянии миоглобин имеет практически одинаковую структуру

С помощью рентгеноструктурного анализа высокого разрешения была получена замечательно детальная, хотя статическая, картина молекулы миоглобина. Возникает существенный вопрос: имеет ли растворенный миоглобин такую же структуру, как миоглобин кристаллический? Кристаллический миоглобин отличается от растворенного в том отношении, что в процессе кристалли-

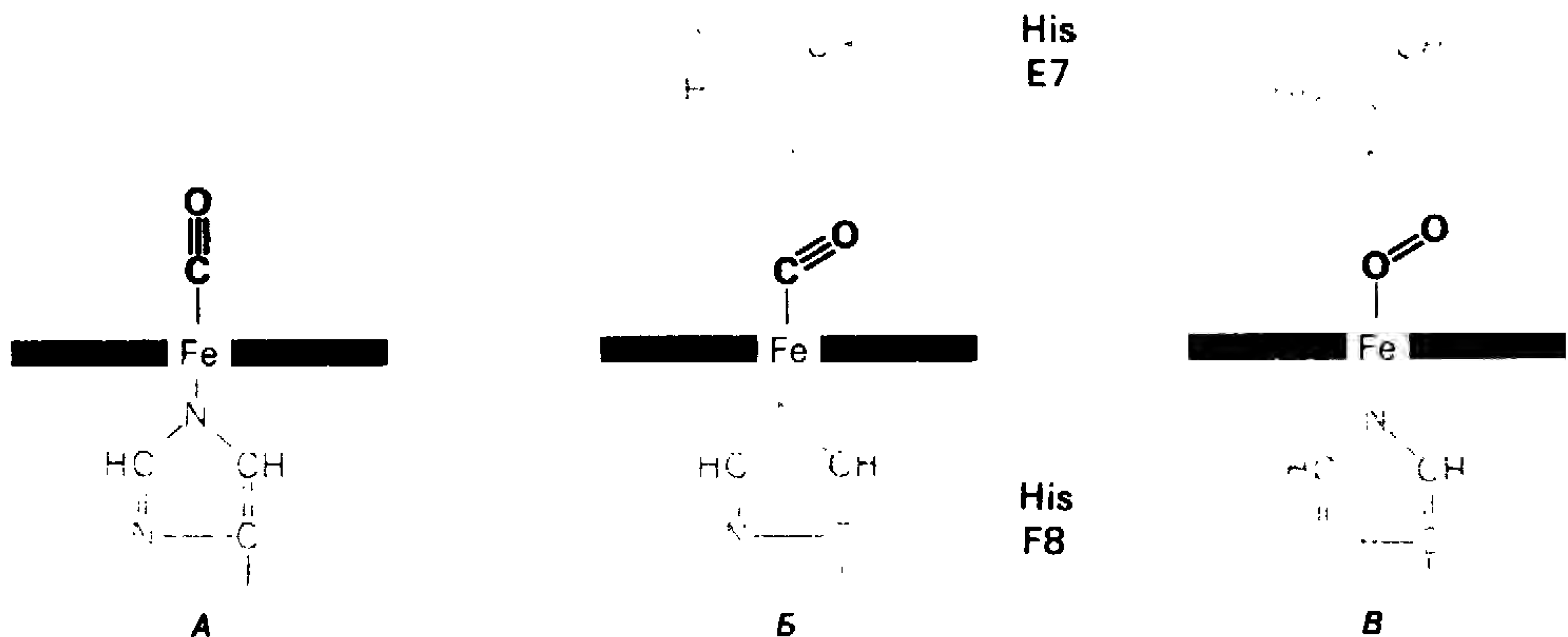


Рис. 3.21. Структурная основа пониженного сродства миоглобина и гемоглобина к оксиду углерода. *А* – связь CO расположена на одной прямой со свободным железопорфирином; *Б* – наклонная геометрия связи CO с миоглобином и гемоглобином, обусловленная тем, что дистальный гистидин (E7) препятствует прямолинейному связыванию CO, в результате сродство к CO оказывается значительно сниженным; *В* – наклонная геометрия связи O_2 с миоглобином и гемоглобином. Связь O_2 со свободными железопорфиринами также имеет наклонную геометрию.

зации он подвергается воздействию высокой ионной силы [$3M(NH_4)_2SO_4$] и между его отдельными молекулами возникают взаимодействия. Могут ли эти факторы так изменить структуру миоглобина, что картина, полученная при рентгеноструктурном анализе, не приближает нас к пониманию его биологической функции? Ответ на этот вопрос – решительное нет. Имеется целый ряд доказательств, что *структура миоглобина в растворенном виде и в виде кристалла очень сходна.*

1. В кристаллическом состоянии миоглобин функционально активен: он способен присоединять кислород, хотя реакция протекает и не так быстро, как в растворе. В целом реакционноспособность миоглобина в кристаллическом состоянии понижена.

2. Спектр поглощения, характерный для группы гема в миоглобине, растворенном или кристаллическом, один и тот же. Спектры поглощения служат очень чувствительным показателем особенностей микроокружения гема.

3. Содержание α-спиралей в растворенной молекуле оценивают по дисперсии оптического вращения и по круговому дихроизму. Измеренное таким образом количество α-спиралей хорошо согласуется с числом α-спиралей, полученным при анализе карты электронных плотностей кристалла. Маловероятно, чтобы значительные изменения конформации не сопровождались бы изменением числа спиралей в структуре белка.

4. Рентгеноструктурный анализ миоглобина тюленя показал, что третичная структура этого белка очень близка таковой миоглобина кита. В противоположность этому кристаллические решетки этих миоглобинов весьма различны, а следовательно, и взаимодействия между молекулами в этих двух кристаллах неодинаковы. Таким образом, маловероятно, чтобы значительные искажения структуры были бы обусловлены кристаллической решеткой.

3.9. Неполярные взаимодействия играют важную роль в стабилизировании конформации миоглобина

Рентгеноструктурный анализ выявляет структуру миоглобина, но не объясняет, почему молекула имеет данную структуру, а не иную. В сущности, одна из задач белковой химии и состоит в том, чтобы определить, каким образом аминокислотная последовательность задает трехмерную струк-

туру белка. Изучение миоглобина показало, что внутренняя часть молекулы состоит из плотно упакованных неполярных остатков. Остатки таких аминокислот, как валин, лейцин, изолейцин, метионин и фенилаланин являются *гидрофобными*. При возможности выбора между водой и неполярной средой они явно предпочитают последнюю. Далее, при плотной упаковке их боковые цепи оказываются сближенными и между ними возникают вандерваальсовы силы притяжения. Таким образом, значительная сила притяжения, обеспечивающая скручивание белковой молекулы, связана с гидрофобностью указанных аминокислотных остатков, т.е. с их тенденцией к отталкиванию воды. Эти гидрофобные боковые цепи оказываются термодинамически более стабильными, если они сгруппированы внутри молекулы, а не развернуты в водной среде. Повышение стабильности при скручивании молекулы белка обусловлено ростом энтропии, происходящим при упорядоченном распределении молекул воды вокруг доступных гидрофобных групп (разд. 6.26). Итак, полипептидная цепь в водном растворе спонтанно скручивается так, что ее гидрофобные боковые цепи оказываются спрятанными внутри, а полярные, заряженные цепи – на поверхности молекулы.

3.10. Развернутая молекула миоглобина спонтанно принимает функционально активную конфигурацию

Оказывает ли гем влияние на пространственную структуру миоглобина? Ответ был получен при изучении *апомиоглобина*, т.е. миоглобина, лишенного гема. Апомиоглобин получают из миоглобина путем понижения pH раствора до 3,5. Поскольку при таком закислении связь между гемом и белком становится слабой, для отделения гема от белка используют экстрагирование органическим растворителем. Далее водную фазу, содержащую апомиоглобин, нейтрализуют. Измерения дисперсии оптического вращения показали, что при нейтральном значении pH степень α-спирализации в апомиоглобине составляет 60%, что значительно меньше, чем в миоглобине (75%). По данным гидродинамических исследований апомиоглобин менее компактен, чем миоглобин. Более того, стабильность апомиоглобина гораздо ниже стабильности миоглобина. Следовательно, *наличие гема оказывает заметный эффект на структуру миоглобина.*

Является ли скручивание апомиоглобина и последующее включение гема спонтанным процессом? Если к нейтральному раствору апомиоглобина добавить мочевину или гуанидин, то молекула белка разворачивается (денатурирует). Содержание α-спиралей в этих условиях (т.е. в 8 М растворе мочевины) близко к нулю. После удаления мочевины путем диализа степень α-спирализации возрастает до 60%, т.е. апомиоглобин вновь скручивается. Последующее добавление гема к этому раствору приводит к образованию биологически активного миоглобина (рис. 3.22). При восста-

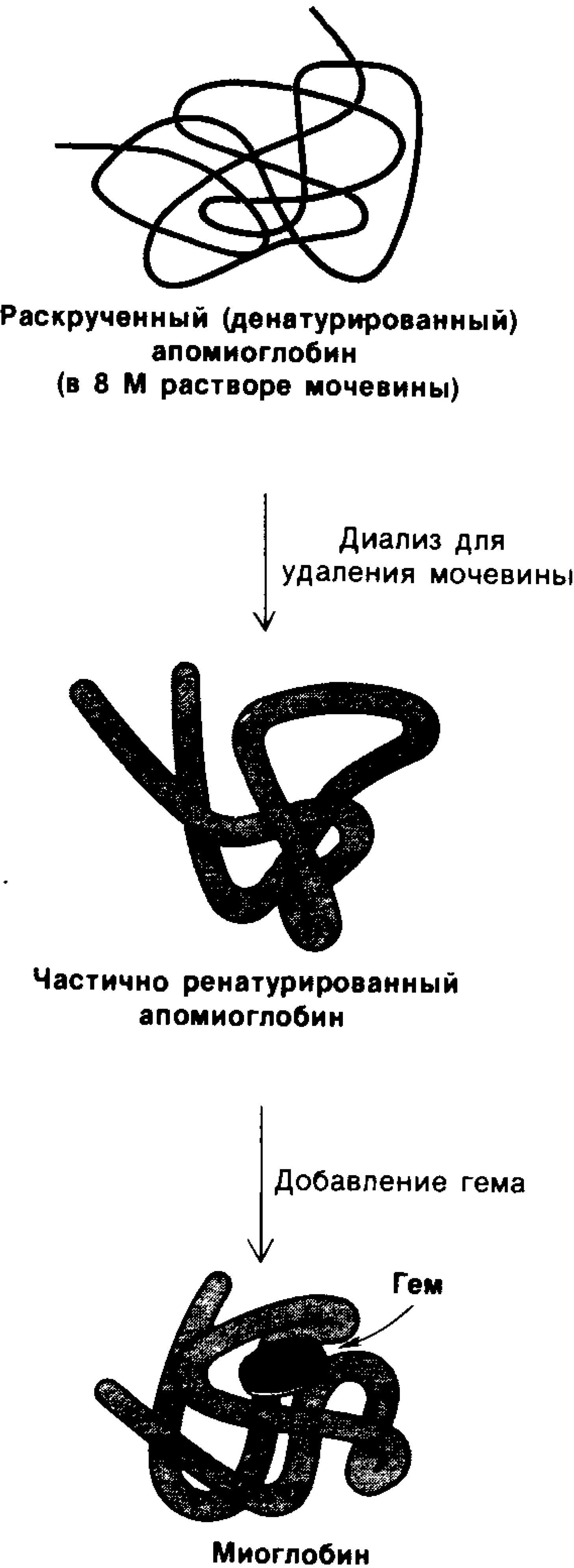


Рис. 3.22. Образование миоглобина из денатурированного апомиоглобина.

Положение в спирали

	F1	F2 F3	F4 F5 F6 F7 F8 F9
β-Цепь	-Phe-	[redacted]	-Leu-Ser-Glu-Leu-His-Cys-
δ-Цепь	-Phe-		-Leu-Ser-Glu-Leu-His-Cys-
γ-Цепь	-Phe-		-Leu-Ser-Glu-Leu-His-Cys-

↖ ↗

Единственные различия в последовательностях из 9 аминокислот

Рис. 3.23. β-, γ- и δ-Цепи гемоглобинов человека обладают сходными аминокислотными последовательностями. Для примера показаны участки трех цепей с остатками от F1 до F9.

новлении в ферромиоглобин такой ренатурированный белок способен обратимо связывать кислород с исходной эффективностью. Следовательно, *сложная трехмерная структура миоглобина заложена в самой природе аминокислотной последовательности апомиоглобина,* соединенного с простетической группой гема. Этот вывод подтвердил универсальность принципа, впервые открытого при исследовании ренатурации рибонуклеазы, а именно: *последовательность аминокислот определяет конформацию белка.*

3.11. Гемоглобин состоит из четырех полипептидных цепей

Обратимся теперь к гемоглобину – белку, родственному миоглобину. Если миоглобин состоит из одной полипептидной цепи, то гемоглобин – из четырех. Эти четыре цепи удерживаются вместе нековалентными связями. Каждая цепь содержит один гем, и, таким образом, в молекуле гемоглобина имеются четыре участка связывания кислорода. Гемоглобин А – основной гемоглобин взрослого организма – состоит из двух цепей одного типа, называемых α-цепи, и двух цепей другого типа, называемых β-цепи. В целом *субъединичная структура гемоглобина А описывается формулой* $\alpha_2\beta_2$. У взрослых есть, кроме того, минорный гемоглобин A_2, на долю которого приходится примерно 2% общего количества гемоглобина; субъединичная структура этого гемоглобина $\alpha_2\delta_2$. Эмбрионы содержат другие гемоглобины. На ранних этапах эмбрионального развития выявляется гемоглобин плода $\alpha_2\varepsilon_2$. На смену ему приходит гемоглобин F с субъединичной структурой $\alpha_2\gamma_2$. Биологическое значение этих разных гемоглобинов представляет собой очень интересную проблему, которую мы обсудим в следующей главе. Общая для всех перечисленных гемоглобинов α-цепь содержит 141 аминокислотный остаток. β-, δ- и γ-Цепи содержат по 146 остатков с очень схожей последовательностью аминокислот (рис. 3.23).

3.12. Рентгеноструктурный анализ гемоглобина

Как упоминалось ранее, пространственную структуру гемоглобина А определили Макс Перутц и сотрудники. Этот монументальный труд был начат в 1936 г., когда для выполнения дипломной работы Перутц уехал из Австрии в Англию в Кембридж и начал работать в лаборатории Джона Бернала (J. Bernal), где двумя годами ранее были получены первые рентгеновские отпечатки кристаллов белка. Бернал и студентка-дипломница Дороти Кродфут Ходжкин (D. C. Hodgkin) получили отличные отпечатки дифракции пепсина и таким образом показали, что белкам свойственна точно определенная структура. Еще в 1934 г. они предсказали перспективность применения рентгеноструктурного анализа как метода, «позволяющего получить гораздо более подробные сведения о белковой структуре по сравнению с тем, что могли дать предше-

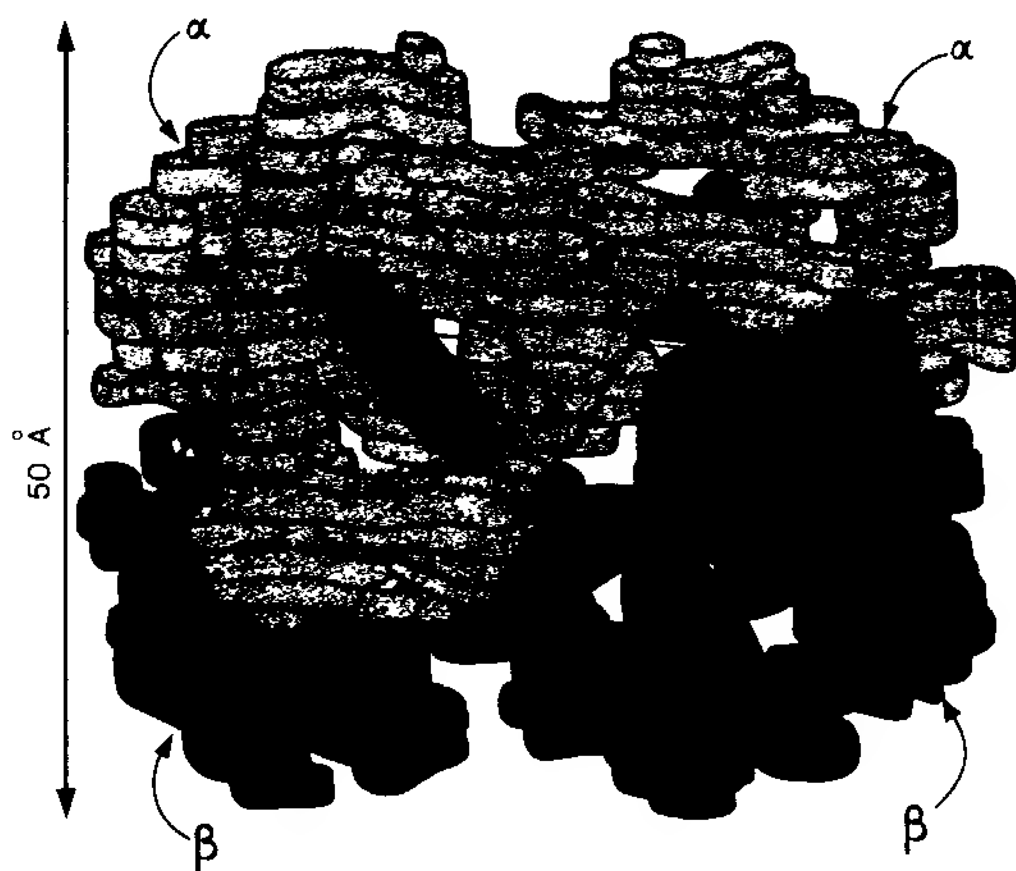
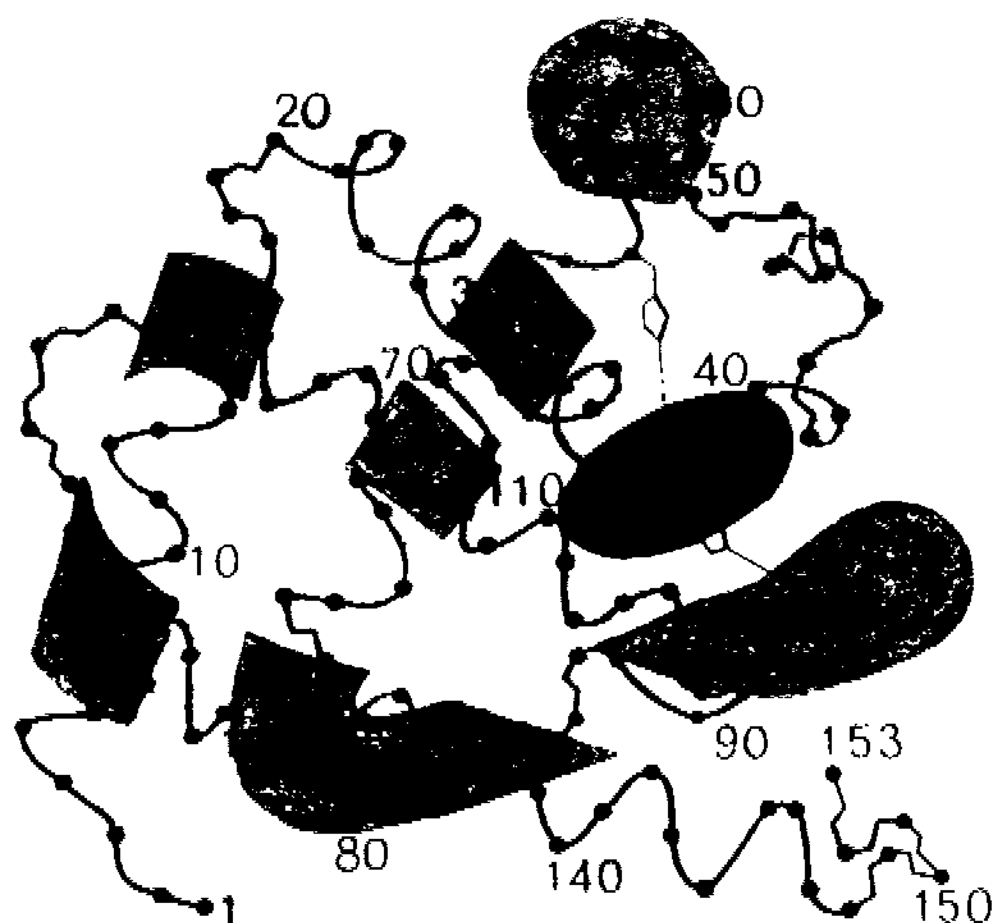


Рис. 3.24. Модель гемоглобина при низком разрешении. α-Цепь показана желтым, β-цепь – синим, гем – красным. (Perutz M. F., The hemoglobin molecule, Scientific American, Inc., 1964.)



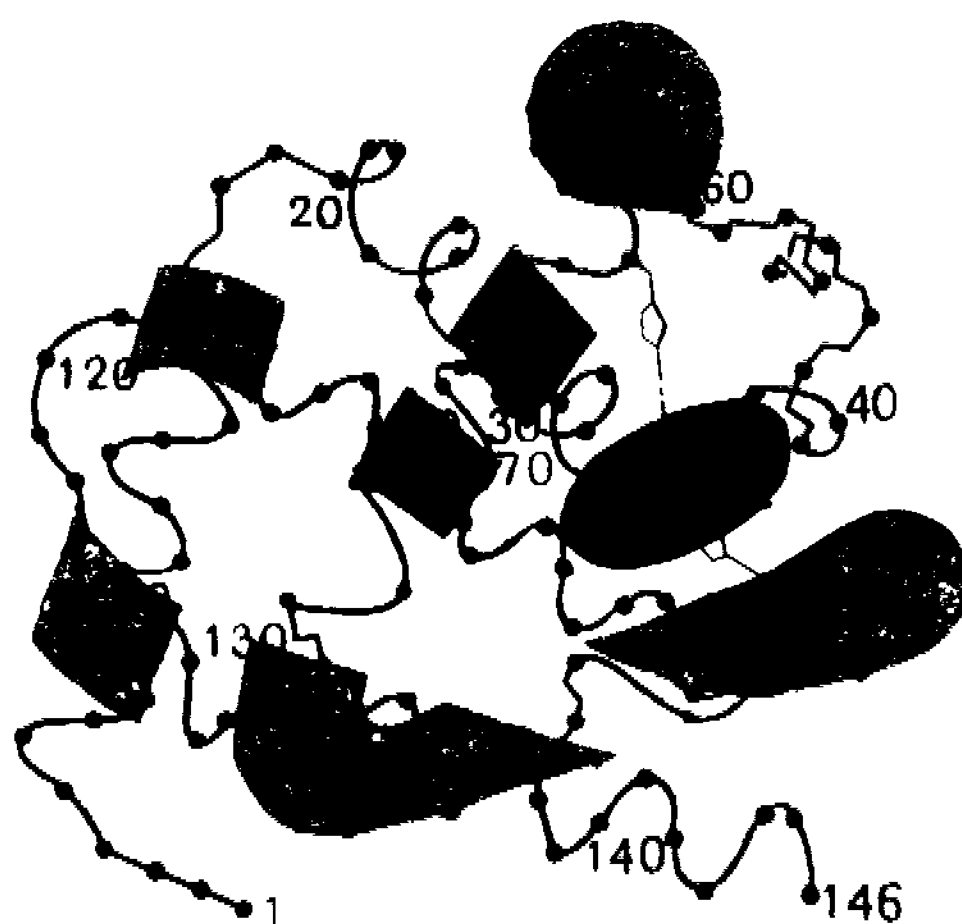


Рис. 3.25. Сравнение конформаций главной цепи миоглобина и β-цепи гемоглобина. Сходство конформаций совершенно очевидно. (Perutz M.F., The hemoglobin molecule, Scientific American, Inc., 1964.)

ствовавшие физические и химические подходы». Прошло, однако, более 20 лет, прежде чем этот прогноз оправдался. В тот период, когда Перутц избрал объектом своей работы гемоглобин, самым высокомолекулярным соединением с расшифрованной структурой был краситель фталоцианин, состоящий из 58 атомов. Перутц же взялся за молекулу в сотни раз большую. Не удивительно, что «мои товарищи смотрели на меня с жалостливой улыбкой... По счастью, экзаменаторы, принимавшие мою дипломную работу, не настаивали на окончательном установлении структуры, иначе бы я оставался студентом-дипломником в течение 23 лет». Однако Лоуренс Брэгг (L. Bragg), который вместе со своим отцом впервые в 1912 г. применил рентгеноструктурный анализ, стал в это время во главе Кавендишской лаборатории и поддержал работу Перутца. Он писал: «Я не обманывал себя в отношении перспективы. Дело выглядело так, как если бы нулевую вероятность успеха помножили на бесконечную важность искомого результата; результат этой математической операции был никому не известен». Успех пришел в 1959 г., когда Перутц получил карту электронной плотности низкого разрешения для оксигемоглобина лошади. Впоследствии были получены карты высокого разрешения как для окси-, так и дезоксигемоглобина лошади и человека. Гемоглобины этих двух видов очень близки по своей структуре.

3.13. Четвертичная структура гемоглобина

Молекула гемоглобина имеет почти правильную форму шара диаметром 55 Å. Четыре цепи, образующие молекулу гемоглобина, расположены в виде тетраэдра (рис. 3.24). Четыре гема, по одному у каждой субъединицы, находятся в углублениях на внешней стороне молекулы. Эти четыре кислородсвязывающих участка расположены далеко друг от друга: расстояние между двумя ближайшими атомами железа составляет 25 Å. Каждая α-цепь контактирует с обеими β-цепями. В то же время взаимодействия между двумя α- или между двумя β-цепями незначительны.

3.14. α- и β-Цепи гемоглобина очень сходны с миоглобином

Пространственные структуры миоглобина и α- и β-цепей гемоглобина обладают поразительным сходством (рис. 3.25). Близкое подобие в конфигурации основных цепей этих белков оказалось неожиданным, поскольку в последовательности аминокислотных остатков в этих трех полипептидных цепях существует много различий. Собст-

Гемоглобин человека	F1 F2 F3	F4	F5 F6 F7	F8	F9
		Положение в спирали			
α-Цепь	-Leu-Ser-Ala-	Leu	-Ser -Asp-Leu-	His	-Ala-
β-Цепь	-Phe-Ala-Thr-	Leu	-Ser -Glu-Leu-	His	-Cys-
Миоглобин кашалота	-Leu-Lys-Pro-	Leu	-Ala -Gln-Ser-	His	-Ala-

Единственные идентичные остатки в последовательностях из 9 аминокислот

Рис. 3.26. Сравнение аминокислотных последовательностей миоглобина кашалота и α- и β-цепей гемоглобина человека на примере участка от остатка F1 по остатка F9. Последовательности аминокислот имеют гораздо меньше сходства, чем пространственные структуры этих трех полипептидных цепей.

венно только 24 положения из 141 идентичны во всех трех полипептидных цепях; это показывает, что очень сходные пространственные структуры могут быть обусловлены совершенно разной последовательностью аминокислот (рис. 3.26).

Совершенно очевидно, что пространственная конфигурация миоглобина кашалота и α- и β-цепей гемоглобина человека имеет общебиологическое значение. В сущности, эта структура свойственна всем миоглобинам и гемоглобинам позвоночных. *Сложная конфигурация полипептидной цепи, впервые выявленная на примере миоглобина,– это та основная форма, которую природа предназначила для переносчика кислорода: смысл ее в том, что вокруг гема создается такое микроокружение, которое обеспечивает обратимость связывания кислорода.*

3.15. Критически необходимые остатки в последовательности аминокислот

К настоящему времени расшифрованы последовательности аминокислот в гемоглобинах более чем 20 видов животных (от миноги до человека). Полученные данные выявили значительное разнообразие аминокислот в большинстве положений. Есть, однако, 9 положений в последовательности, где стоят одни и те же аминокислоты у всех или почти всех обследованных видов (табл. 3.2). Эти консервативные (инвариантные) положения имеют особо важное значение для функции гемоглобина. Некоторые из них входят в состав непосредственно участка связывания кислорода. К числу других консервативных положений относится тирозин-НС2, который стабилизирует молекулу, образуя водородную связь между спиралями Н и F. Глицин (В6) сохраняется благодаря своему небольшому размеру: боковая цепь более крупная, чем 1 атом водорода, препятствовала бы сближению спиралей В и Е (рис. 3.27); пролин-С2 имеет важное значение, так как им завершается спираль С.

Значительную вариабельность проявляют неполярные остатки внутренней части молекулы гемоглобина. Однако во всех случаях – это замена одного неполярного остатка на другой, также неполярный (например, аланина на изолейцин). Таким образом, *выраженный неполярный характер внутренней части молекулы сохраняется неизменным.* Как было указано выше, в обратимом оксигенировании гема важную роль играет его расположение в неполярной ни-

Таблица 3.2. **Консервативные аминокислотные остатки в гемоглобине**

Положение	Аминокислота	Функция
F8	Гистидин	Проксимальный связанный с гемом гистидин
E7	Гистидин	Дистальный гистидин вблизи гема
CD1	Фенилаланин	Контакт с гемом
F4	Лейцин	То же
B6	Глицин	Разрешает сближение спиралей В и Е
C2	Пролин	Терминирование спирали
HC2	Тирозин	Перекрестная связь между спиралями Н и F
C4	Треонин	Не установлена
H10	Лизин	» »

ше, где он защищен от воды. Кроме того, наличие внутренней неполярной сердцевины (core) в молекуле гемоглобина стабилизирует его пространственную структуру.

Остатки аминокислот на поверхности молекулы крайне вариабельны. В самом деле, очень немногие из них имеют устойчивый положительный или отрицательный заряд. Казалось бы, остатки пролина должны проявлять постоянство, поскольку ими завершаются участки спирализации. Однако это не так. Инвариантен только один пролиновый остаток, и в то же время во всех миоглобинах соответствующие длины и направления спиралей практически одинаковы. Очевидно, существуют другие пути терминирования и изгиба α-спиралей.

3.16. Возникновение гемоглобина – новый этап в эволюции

До сих пор мы акцентировали внимание на структурном сходстве между миоглобином и гемоглобином. Однако функционально эти две молекулы совершенно различны. Субъединицы гемоглобина имеют ту же конфигурацию, что и миоглобин. Но соединение субъединиц с образованием тетрамера $\alpha_2\beta_2$ приводит к появлению новых свойств огромного биологического значения. Этому вопросу посвящена следующая глава.

Заключение

Миоглобин и гемоглобин – белки, выполняющие у позвоночных роль переносчиков кислорода. Миоглобин облегчает перенос кислорода в мышцах и обеспечивает его накопление в этой ткани. Гемоглобин, находящийся в эритроцитах, является переносчиком кислорода в крови. Способность этих белков связывать кислород обусловлена наличием в их молекуле прочно связанной простетической группы гема. Гем представляет собой замещенный порфирин с центрально расположенным атомом железа. Железо в геме может быть в ферроформе (+2) или ферриформе (+3). Только ферроформа способна связывать O_2.

Миоглобин представлен одной полипептидной цепью, состоящей из 153 аминокислотных остатков (17,8 кДа), и имеет компактную форму. Во внутренней части молекулы находятся почти исключительно неполярные остатки, тогда как снаружи рас-

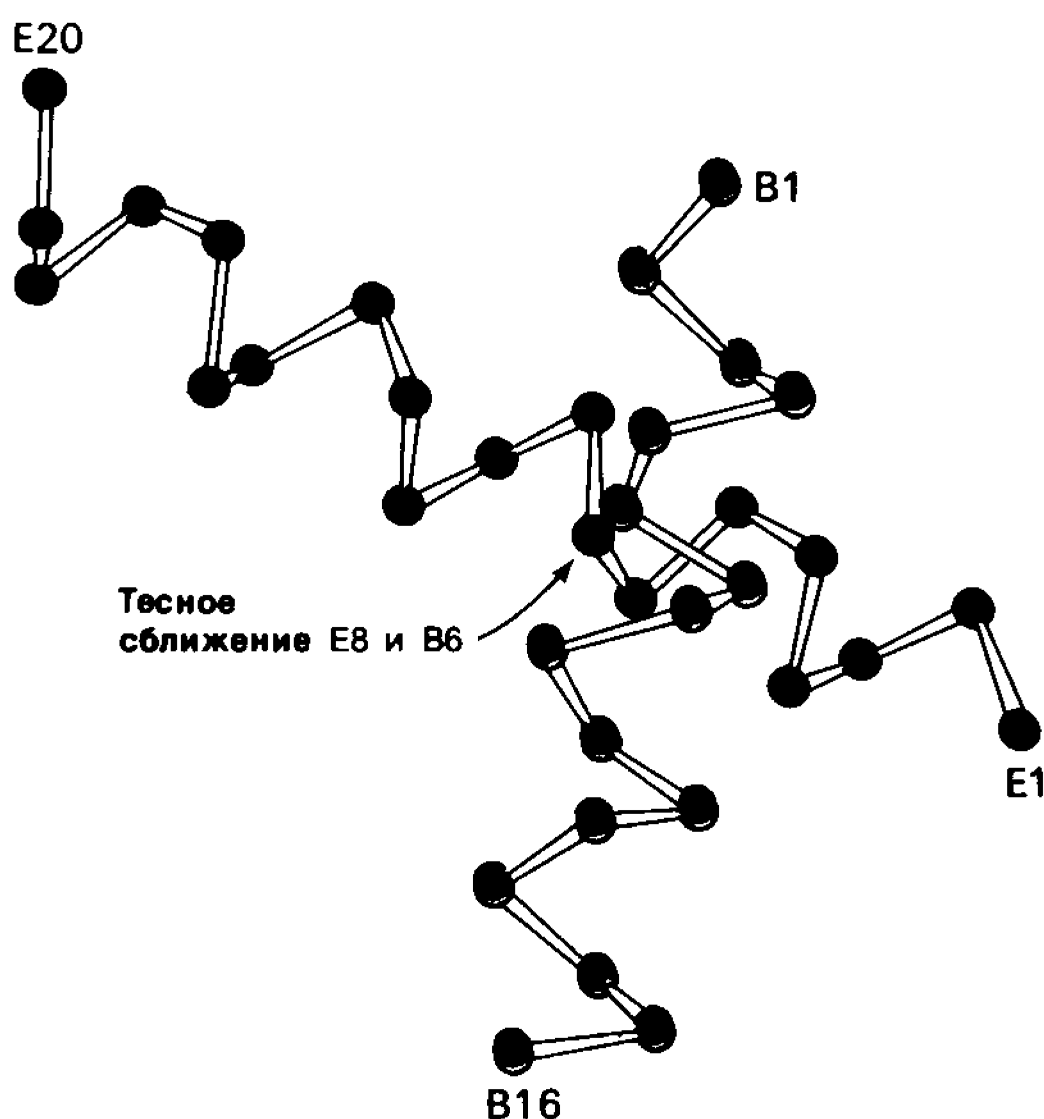


Рис. 3.27. Перекрест цепей B и E в миоглобине. В положении B6 практически всегда стоит глицин, поскольку для более длинной, чем у глицина, боковой цепи нет места.

положены и полярные, и неполярные аминокислотные остатки. Около 75% полипептидной цепи имеет структуру α-спирали, причем имеется 8 спирализованных участков. Единственный феррогем локализован в неполярной нише, что защищает его от окисления в ферриформу. Атом железа в геме непосредственно связан с атомом азота боковой цепи гистидина. Этот проксимальный гистидин (F8) занимает пятое координационное положение. Шестое координационное положение по другую сторону плоскости гема – это участок связывания O_2. Второй гистидин, называемый дистальным (E7), расположен непосредственно рядом с этим участком. Проксимальный гистидин повышает сродство гема к кислороду, а дистальный гистидин оказывает стерический эффект, снижая связывание оксида углерода. Дистальный гистидин и другие аминокислотные остатки вблизи шестого координационного положения подавляют также окисление гема в ферриформу.

Из смеси денатурированного (с развернутой структурой) апомиоглобина и гема можно получить функционально активный миоглобин. Такой опыт по ренатурации показывает, что конформация миоглобина

предопределена последовательностью аминокислот в нем; аналогичное явление впервые было установлено в отношении рибонуклеазы. Во внутренней части молекулы миоглобина сгруппированы неполярные аминокислотные остатки, что, по-видимому, обеспечивает взаимное притяжение, необходимое для образования свернутой компактной структуры.

Гемоглобин состоит из четырех полипептидных цепей, каждая из которых содержит гем. Гемоглобин А – основной гемоглобин взрослого организма – имеет субъединичную структуру $\alpha_2\beta_2$. Гемоглобин A_2 – минорный гемоглобин взрослых – имеет состав $\alpha_2\delta_2$, а эмбриональный гемоглобин F – $\alpha_2\gamma_2$. Пространственные структуры α- и β-цепей гемоглобина и миоглобина обладают поразительным сходством, несмотря на большие различия в последовательности аминокислотных остатков. Сравнение последовательности аминокислот в гемоглобинах многих видов животных показало, что положение девяти аминокислот остается во всех случаях практически инвариантным. К этой группе консервативных аминокислотных остатков относится несколько остатков, расположенных вблизи гема, в частности проксимальный и дистальный гистидины. Консервативным свойством является также выраженная неполярность внутренней части структуры каждой субъединицы.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Kendrew J.C., 1961. The three-dimensional structure of a protein molecule, Sci. Amer., **205** (6), 96–111.

Perutz M.F., 1964. The hemoglobin molecule, Sci. Amer., **211** (5), 64–76.

Kendrew J.C., 1963. Myoglobin and the structure of proteins, Science, **139**, 1259–1266.

Рентгеноструктурная кристаллография

Matthews B.W., 1977. X-ray structure of proteins. In: Neurath H. and Hill R.L. (eds.), The Proteins (3rd ed.), vol. 3, pp. 404–590, Academic Press.

Holmes K.C., *Blow D.M.*, 1965. The Use of X-ray Diffraction in the Study of Protein and Nucleic Acid Structure, Wiley-Interscience. (Прекрасное описание одного из наиболее важных методов в биохимии.)

Glusker J.P., *Truebloob K.N.*, 1972. Crystal Structure Analysis: A Primer, Oxford University Press. (Ясное, четкое описание общих принципов рентгеноструктурной кристаллографии.)

Структура миоглобина и гемоглобина

Watson H.C., 1969. The stereochemistry of the protein myoglobin, Prog. Stereochem., **4**, 299–333. (Подробное описание трехмерной структуры ферримиоглобина кашалота; приведены атомные координаты всех, кроме водорода, атомов в структуре.)

Takano T., 1977. Structure of myoglobin refined at 2,0 Å resolution, J. Mol. Biol., **110**, 537–584. (Структурный анализ ферримиоглобина и дезоксимиоглобина кашалота.)

Phillips S.E.V., 1978. Structure of oxymyoglobin, Nature, **273**, 247–248.

Steigemann W., *Weber E.*, 1979. Structure of erythrocruorin in different ligand states refined at 1,4 Å resolution, J. Mol. Biol., **127**, 309–338. (Структурный анализ высокого разрешения мономерного гемоглобина насекомых, похожего на миоглобин и гемоглобин.)

Perutz M.F., 1976. Structure and mechanism of haemoglobin, Brit. Med. Bull., 32, 195–208.

Ренатурация миоглобина

Harrison S.C., *Blout E.R.*, 1965. Reversible conformational changes of myoglobin and apomyoglobin, J. Biol. Chem., **240**, 299–303.

Физиологические аспекты

Wittenberg J.B., 1970. Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in oxygen entry into muscle, Physiol. Rev., **50**, 559–636.

Garby L., *Meldon J.*, 1977. The Respiratory Functions of Blood, Plenum.

Молекулярная эволюция

Zuckerkandl E., 1965. The evolution of hemoglobin, Sci. Amer., **212** (5), 110–118.

Dayhoff M.O., *Hunt L.T.*, *McLaughlin P.J.*, *Jones D.D.*, 1972. Gene duplications in evolution: the globins. In: Dayhoff M.O. (ed.), Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, pp. 17–30. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland.

Модельные системы

Collman J.P., 1977. Synthetic models for the oxygen-binding hemoproteins, Acc. Chem. Res., **10**, 265–272. (В высокой степени информативный обзор по проблеме замещенных «огороженных» порфиринов.)

Collman J.P., *Brauman J.I.*, *Halbert T.R.*, *Suslick K.S.*, 1976. Nature of O_2 and CO binding to metalloporphyrins and heme proteins, Proc. Nat. Acad. Sci., **73**, 3333–3337. (Описываются структурные основы пониженного связывания окиси углерода миоглобином и гемоглобином.)

Traylor T.G., 1978. Hemoprotein oxygen transport: models and mechanisms. In: van Tamelen E.E. (ed.), Bioorganic Chemistry, vol. 4, pp. 437–468, Academic Press.

Вопросы и задачи

1. Объем эритроцита в среднем составляет 87 мкм^3. Концентрация гемоглобина в эритроцитах – в среднем 34 г/100 мл.

а) Сколько по весу гемоглобина содержится в одном эритроците?

б) Сколько молекул гемоглобина содержится в одном эритроците?

в) Может ли концентрация гемоглобина в эритроцитах сильно увеличиться? (Подсказка: исходите из предположения, что гемоглобин в эритроцитах представлен в виде кубических кристаллов с длиной ребра 65 Å.)

2. Сколько железа содержится в гемоглобине человека весом 70 кг? Примем, что объем крови составляет 70 мл/кг и содержание гемоглобина в крови – 16 г/100 мл.

3. Содержание миоглобина в некоторых мышцах у человека составляет 8 г/кг мышц. У кашалота эта величина достигает 80 г/кг мышц.

а) Сколько кислорода связывается миоглобином в мышце человека и в мышце кашалота? Предполагается, что миоглобин насыщен O_2.

б) В воде тканей (в состоянии равновесия с венозной кровью при $t = 37°C$) растворяется примерно $3{,}5 \cdot 10^{-5}$ М O_2. Каково соотношение между кислородом, связанным с миоглобином, и свободнорастворенным кислородом в мышце кашалота?

4. Миоглобин кашалота имеет следующий аминокислотный состав:

Ala 5	Gln 5	Leu 18	Ser 6
Arg 4	Glu 14	Lys 19	Thr 5
Asn 2	Gly 11	Met 2	Trp 2
Asp 6	His 12	Phe 6	Tyr 3
Cys 0	Ile 9	Pro 4	Val 8

а) Определите общий заряд ферромиоглобина при pH 2, 7 и 9.

б) Определите изоэлектрическую точку миоглобина. Изоэлектрическая точка – это значение pH, при котором молекула не имеет заряда.

5. Раствор миоглобина обработан бромистым цианом.

а) Каковы продукты расщепления? Воспользуйтесь приведенной последовательностью аминокислот в молекуле миоглобина.

б) В водном растворе продукты расщепления содержат очень мало α-спирализованных участков. Как это характеризует стабильность α-спиралей в водной среде?

6. Связывание кислорода с миоглобином описывается простым выражением равновесия:



$$\mathrm{Mb} + \mathrm{O_2} \rightleftarrows \mathrm{MbO_2}.$$

Пусть [Mb] – концентрация дезоксимиоглобина; [MbO_2] – концентрация оксимиоглобина; pO_2 – концентрация O_2 (выраженная в виде парциального давления O_2); P_{50} – это pO_2, при котором $[\mathrm{Mb}] = [\mathrm{MbO_2}]$. Составьте уравнение, аналогичное уравнению Хендерсона – Хассельбальха, где соотношение оксимиоглобина к дезоксимиоглобину было бы представлено как функция pO_2 и P_{50}.

7. Константа равновесия K для связывания кислорода миоглобином равна 10^{-6} М, причем $K = [\mathrm{Mb}][\mathrm{O_2}]/[\mathrm{MbO_2}]$. Константа скорости связывания O_2 с миоглобином составляет $2 \cdot 10^7$ М$^{-1}\cdot$с$^{-1}$.

а) Какова константа скорости отщепления O_2 от оксимиоглобина?

б) Какова средняя продолжительность существования оксимиоглобинового комплекса?

8. Светопоглощение A раствора определяется как

$$A = \lg(I_0/I),$$

где I_0 – интенсивность падающего света (на входе), а I – интенсивность прошедшего через раствор света (на выходе). Светопоглощение раствора зависит от молярного коэффициента светопоглощения (коэффициент экстинкции) ε (размерность см$^{-1}\cdot$М$^{-1}$), концентрации c (в М) и длины светового пути l (в см):

$$A = \varepsilon l c.$$

Коэффициент экстинкции миоглобина для 580 нм составляет 15000 см$^{-1}\cdot$М$^{-1}$. Каково светопоглощение раствора миоглобина в концентрации 1 мг/мл при длине светового пути 1 см? Какой процент падающего света проходит через раствор?

ГЛАВА 4. Гемоглобин: аллостерический белок

Переход в процессе эволюции от мономерного миоглобина к тетрамерному гемоглобину сопровождался появлением новых свойств. Молекула гемоглобина значительно сложнее, чем молекула миоглобина. Прежде всего гемоглобин помимо O_2 транспортирует H^+ и CO_2. Во-вторых, связывание кислорода гемоглобином регулируется специфическими компонентами внутренней среды, а именно H^+, CO_2 и органическими фосфорными соединениями. Эти регуляторы оказывают сильнейшее влияние на способность гемоглобина связывать кислород, несмотря на то что они присоединяются к белку в участках, отстоящих далеко от гема. Вообще так называемое *аллостерическое взаимодействие*, т.е. взаимодействие между пространственно разделенными участками, имеет место во многих белках. Аллостерические эффекты играют важнейшую роль в регуляции и интеграции молекулярных процессов в биологических системах. Гемоглобин является наиболее изученным аллостерическим белком, и потому имеет смысл более подробно рассмотреть его структуру и функцию.

4.1. Функциональные различия между миоглобином и гемоглобином

Гемоглобин – аллостерический белок, миоглобин таковым не является. Это различие выражается тремя путями:

1. Присоединение O_2 к гемоглобину повышает связывание дополнительных молекул O_2 той же молекулой гемоглобина. Другими словами, кислород связывается с гемоглобином кооперативно. Связывание кислорода миоглобином, напротив, является некооперативным.

2. Сродство гемоглобина к кислороду зависит от pH, тогда как миоглобин такой зависимости не проявляет. Молекулы CO_2 также влияют на способность гемоглобина связывать кислород.

3. Сродство гемоглобина к кислороду регулируется органическими фосфорными соединениями, в частности бисфосфоглицератом. В результате гемоглобин проявляет меньшее сродство к кислороду, чем миоглобин.

4.2. Кооперативность связывания кислорода гемоглобином

Отношение занятых кислородом участков связывания к их общему числу представляет собой степень насыщения, или просто насыщение гемоглобина кислородом, и обозначается Y. Значение Y изменяется от 0 (все участки свободны) до 1 (все участки заняты). График зависимости Y от парциального да-



Рис. 4.1. Модель гемоглобина при низком разрешении. α-Цепи представлены желтым, β-цепи – синим, гем – красным. (Perutz M.F., The hemoglobin molecule, Scientific American, Inc., 1964.)

вления кислорода pO_2 называется *кривой диссоциации кислорода.* Кривые диссоциации кислорода для гемоглобина и миоглобина различаются в двух отношениях (рис. 4.2 и 4.3). Во-первых, при любом pO_2 для миоглобина насыщение Y выше, чем для гемоглобина. Другими словами, *миоглобин обладает более высоким сродством к O_2, чем гемоглобин.* Сродство к кислороду характеризуют величиной P_{50}, численно равной парциальному давлению кислорода, при котором насыщены 50% участков связывания (т.е. $Y = 0{,}5$). Для миоглобина P_{50} составляет обычно 1 торр, а для гемоглобина – 26 торр.

Торр – единица давления, численно равная тому давлению, которое производит столбик ртути высотой 1 мм при 0°С и стандартном ускорении силы тяжести (1 мм Hg). Названа в честь Эванджелисты Торричелли (1608–1647), изобретателя ртутного барометра.

Второе различие состоит в том, что *кривая диссоциации кислорода в случае миоглобина имеет гиперболическую форму, а в случае гемоглобина – сигмоидную.* Как будет указано ниже, сигмоидная форма кривой идеально соответствует физиологической роли гемоглобина как переносчика кислорода в крови. На молекулярном уровне сигмоидность формы означает, что связывание кислорода гемоглобином происходит кооперативно, т.е. присоединение кислорода к одному гему облегчает его присоединение к остальным.

Рассмотрим кривые диссоциации кислорода с количественной стороны, начав с миоглобина как более простого. Связывание кислорода с миоглобином (Mb) описывается следующим уравнением:



$$MbO_2 \rightleftarrows Mb + O_2. \qquad (1)$$

Константа равновесия процесса диссоциации оксимиоглобина составит

$$K = \frac{[Mb][O_2]}{[MbO_2]}, \qquad (2)$$

где $[MbO_2]$ – концентрация оксимиоглобина, $[Mb]$ – концентрация дезоксимиоглобина, $[O_2]$ – концентрация свободного кислорода, причем все эти величины выражены в молях на литр. Степень насыщения Y определяется как

$$Y = \frac{[MbO_2]}{[MbO_2] + [Mb]}. \qquad (3)$$

Производя замещения в уравнении (3) на основе равенства (2), получаем

$$Y = \frac{[O_2]}{[O_2] + K}. \qquad (4)$$

Поскольку O_2 – это газ, удобнее выражать его концентрацию в виде pO_2, т.е. парциального давления кислорода (в торрах) в окружающей раствор атмосфере. Тогда уравнение (4) принимает следующий вид:

$$Y = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}}. \qquad (5)$$

Уравнение (5) графически выражается гиперболой. В самом деле, кривая диссоциации кислорода, рассчитанная по уравнению (5) при P_{50}, равном 1 торр, хорошо соответствует экспериментальной кривой, полученной для миоглобина.

В отличие от этого для гемоглобина кривая диссоциации кислорода имеет сигмоид-

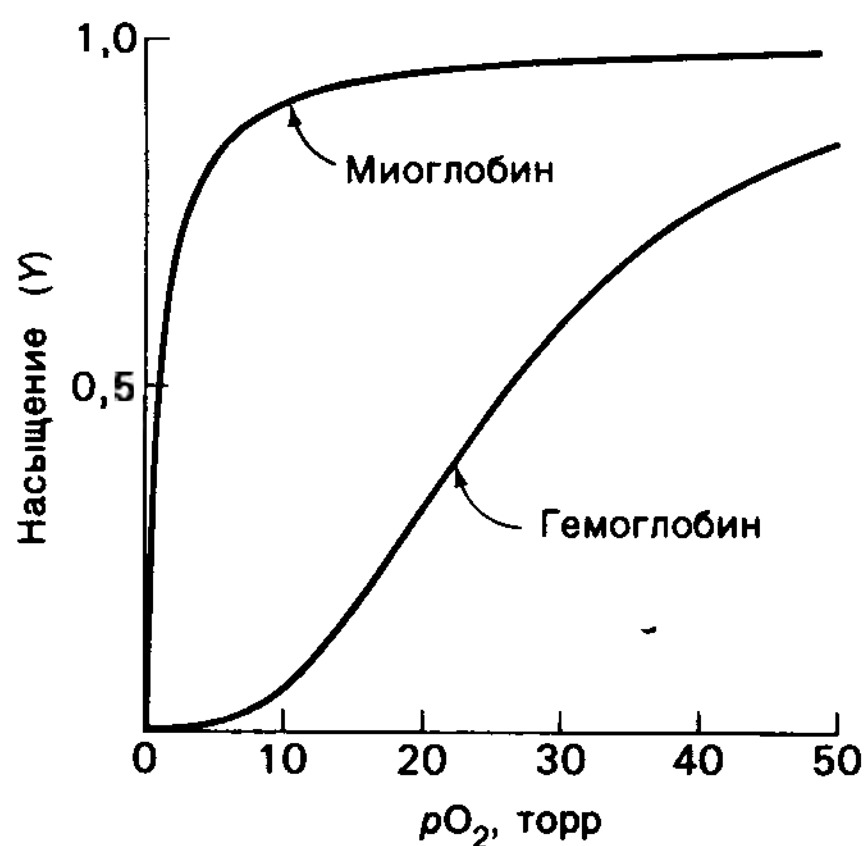


Рис. 4.2. Диссоциационная кривая кислорода для миоглобина и гемоглобина. Насыщенность участков, связывающих кислород, показана как функция парциального давления кислорода в окружающем растворе.

ную форму и не совпадает ни с одной кривой, описываемой уравнением (5). Это свидетельствует о кооперативном связывании O_2 молекулой гемоглобина. Рассмотрим крайний случай, когда имеются только дезоксигемоглобин и гемоглобин (Hb), содержащий 4 связанные молекулы O_2:



$$Hb(O_2)_4 \rightleftarrows Hb + 4O_2. \qquad (6)$$

Константа равновесия этой гипотетической реакции составит

$$K = \frac{[Hb][O_2]^4}{[Hb(O_2)_4]} \qquad (7)$$

и далее

$$Y = \frac{(pO_2)^4}{(pO_2)^4 + (P_{50})^4}. \qquad (8)$$

Графически уравнение (8) выражается сигмоидной кривой (рис. 4.4). Заметим, однако, что расчетная кривая идет круче, чем кривая, полученная экспериментально. Другими словами, схема процесса, описанная

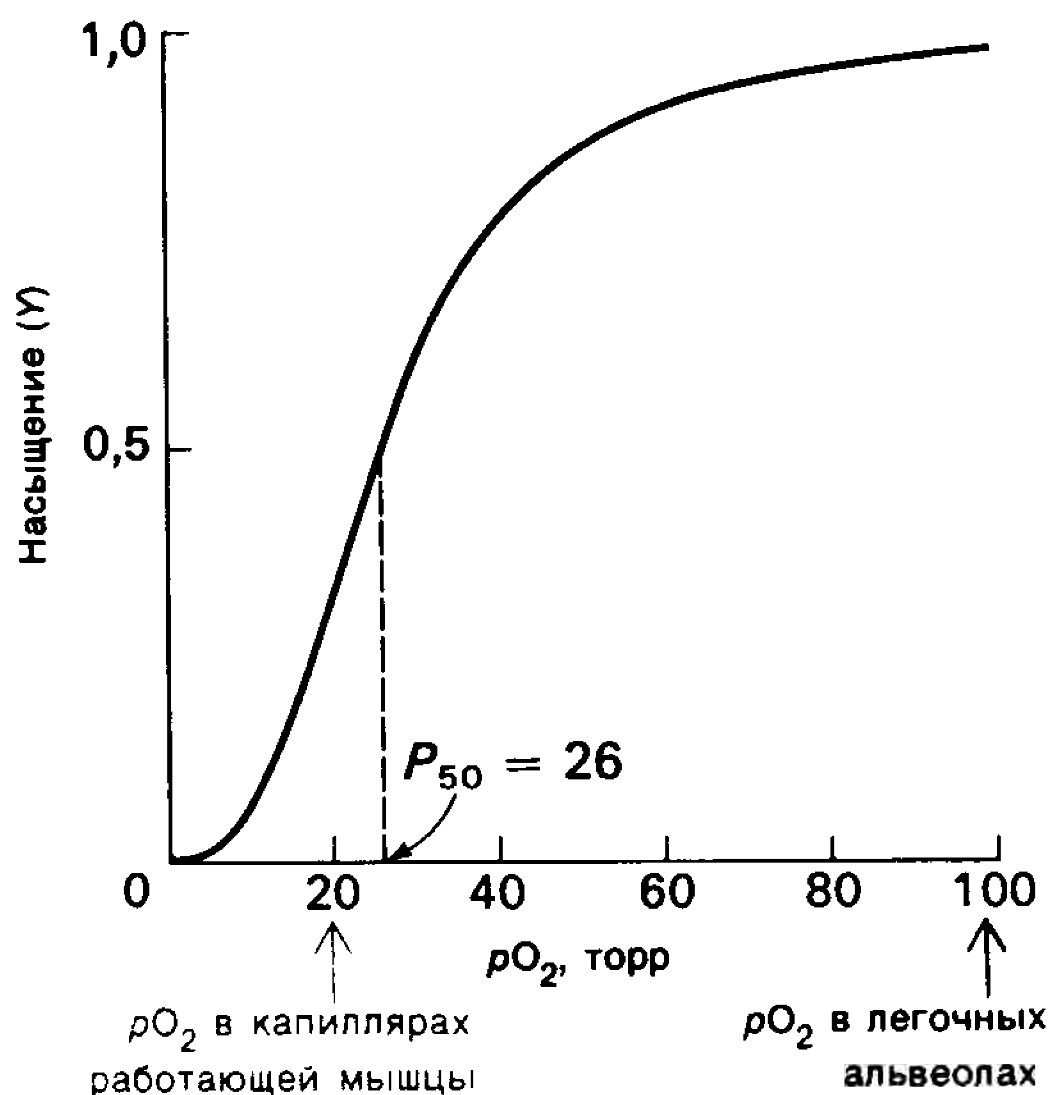


Рис. 4.3. Кривая диссоциации кислорода для гемоглобина. На оси абсцисс отмечены значения pO_2, характерные для капилляров работающей мышцы и для альвеол легких. Обратите внимание, что P_{50} для гемоглобина в физиологических условиях лежит между этими величинами.

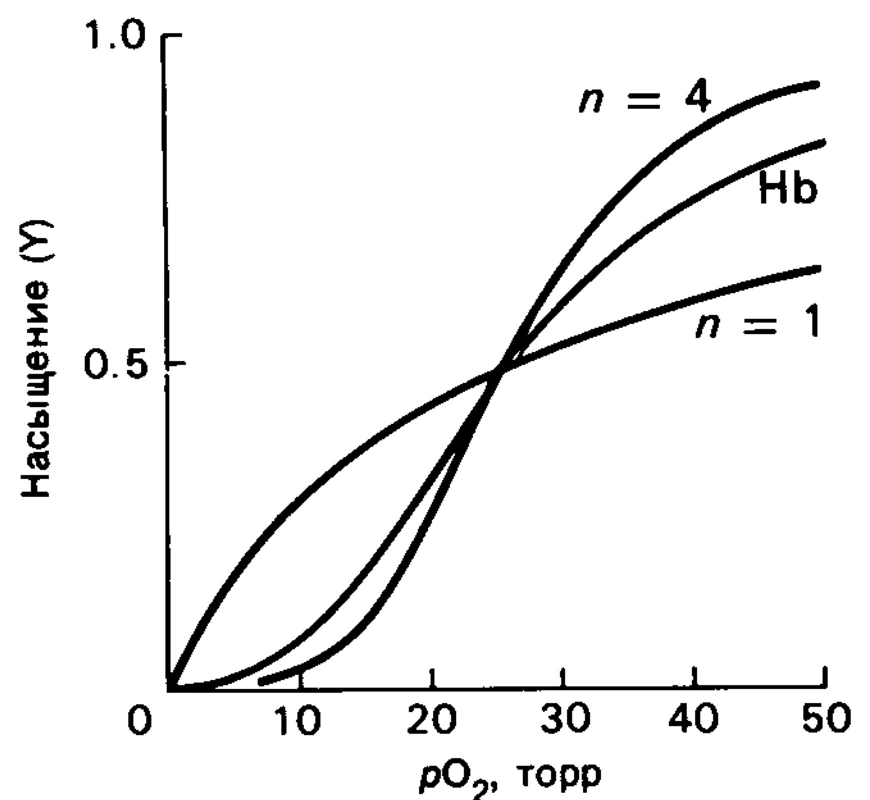


Рис. 4.4. Кривая насыщения гемоглобина кислородом лежит между диссоциационными кривыми, рассчитанными для $n = 1$ (некооперативное связывание) и $n = 4$ (полностью кооперативное связывание).

уравнением (6), является крайностью.

Как же тогда охарактеризовать процесс связывания с промежуточной степенью кооперативности? В 1913 г. Арчибальд Хилл показал, что кривая, построенная по данным определения связывания кислорода гемоглобином, описывается уравнением, соответствующим гипотетическому процессу:



$$Hb(O_2)_n \rightleftarrows Hb + nO_2. \qquad (9)$$

Насыщение Y в этом случае составит

$$Y = \frac{(pO_2)^n}{(pO_2)^n + (P_{50})^n}. \qquad (10)$$

После преобразований получим

$$\frac{Y}{1 - Y} = \left(\frac{pO_2}{P_{50}}\right)^n. \qquad (11)$$

Последнее уравнение показывает, что отношение оксигема (Y) к дезоксигему ($1 - Y$) равно возведенному в n-ю степень отношению pO_2 к P_{50}. Прологарифмируем это уравнение:

$$\lg\left(\frac{Y}{1 - Y}\right) = n \lg pO_2 - n \lg P_{50}. \qquad (12)$$

Подчеркнем, что зависимость $\lg[Y/(1 - Y)]$ от $\lg pO_2$ выразится прямой с углом

наклона n. Такой график называется *графиком Хилла*, а величина наклона n в точке полунасыщения кислородом ($Y = 0,5$) составляет *коэффициент Хилла*.

Миоглобин дает линейный график Хилла с $n = 1,0$, тогда как гемоглобин – с $n = 2,8$ (рис. 4.5). Наклон, равный 1,0, означает, что молекулы кислорода присоединяются к миоглобину независимо друг от друга, как это описано в уравнении (1). С другой стороны, коэффициент Хилла, равный 2,8, указывает на *кооперативное связывание кислорода гемоглобином*. Присоединение O_2 к одному гему облегчает присоединение кислорода к другим гемам того же тетрамера, и обратно: отщепление кислорода от одного гема облегчает его отщепление от остальных. Другими словами, в молекуле гемоглобина имеется взаимосвязь между гемами. Кооперативность связывания кислорода гемоглобином называют иногда *взаимодействием гем—гем*. Механизм его мы обсудим ниже.

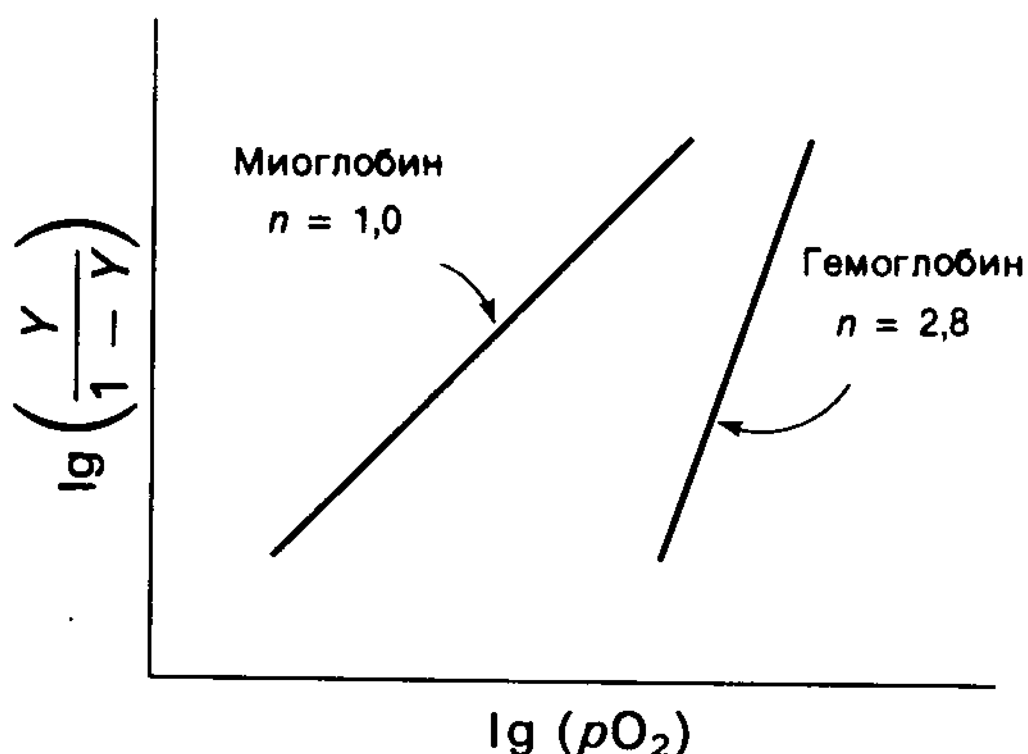


Рис. 4.5. График Хилла для связывания кислорода миоглобином и гемоглобином. Наклон 2,8 для гемоглобина свидетельствует о кооперативном связывании кислорода; миоглобин, напротив, связывает кислород некооперативно, о чем свидетельствует наклон кривой, равный 1,0.

4.3. Кооперативное связывание кислорода гемоглобином увеличивает транспорт кислорода

Кооперативное связывание кислорода повышает эффективность гемоглобина как переносчика кислорода. При изменении парциального давления кислорода насыщение им гемоглобина меняется быстрее, чем это происходило бы в случае независимости всех участков связывания друг от друга. Рассмотрим такой пример. Допустим, что pO_2 в альвеолах легких составляет 100 торр, а в капиллярах работающей мышцы – 20 торр. Пусть $P_{50} = 30$ торр и $n = 2,8$. Тогда Y в капиллярах альвеол составит 0,97, а в капиллярах мышц – 0,25. Количество высвободившегося в тканях кислорода пропорционально разнице в величинах Y, т.е. 0,72. Теперь сделаем тот же расчет для гипотетического переносчика кислорода, который характеризуется тем же $P_{50} = 30$ торр, но некооперативно связывает кислород ($n = 1$). В этом случае $Y_{альвеолы} = 0,77$, $Y_{мышцы} = 0,41$ и $\Delta Y = 0,36$. Отсюда ясно видно, что *кооперативное связывание кислорода гемоглобином по сравнению с некооперативным позволяет удвоить высвобождение кислорода в тканях.*

4.4. H^+ и CO_2 способствуют высвобождению O_2 (эффект Бора)

Изменения pH в широком диапазоне, а также содержание CO_2 не оказывают заметного действия на связывание кислорода миоглобином. В случае гемоглобина, напротив, закисление среды способствует отщеплению кислорода. Снижение pH в физиологических пределах сдвигает кривую диссоциации кислорода вправо, т.е. сродство к кислороду уменьшается (рис. 4.6). Повышение концентрации CO_2 (при постоянном pH) также уменьшает сродство к кислороду. В тканях с высоким уровнем метаболизма, например в работающей мышце, образуется много CO_2 и кислот. *Повышение содержания CO_2 и H^+ в капиллярах активно метаболизирующих тканей способствует отщеплению O_2 от оксигемоглобина.* Этот важный механизм повышенной потребности в кислороде, характерной для тканей с активным метаболизмом, был открыт в 1904 г. Кристианом Бором (Ch. Bohr).

Противоположный эффект, обнаруженный 10 лет спустя Джоном Холдейном (J. Haldane), имеет место в капиллярах легких. Здесь высокая концентрация O_2 способствует отщеплению H^+ и CO_2 от гемоглобина совершенно аналогично тому, как высокая концентрация H^+ и CO_2 в активно метаболизирующих тканях способствует

высвобождению O_2. Эти взаимоотношения между связыванием O_2, H^+ и CO_2 известны под названием *эффект Бора* (рис. 4.7).

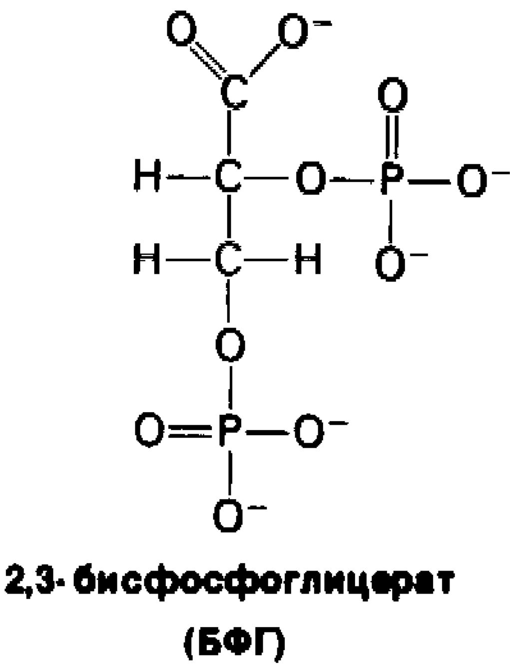
4.5. Бисфосфоглицерат снижает сродство к кислороду

Сродство к кислороду гемоглобина, находящегося в эритроцитах, ниже, чем у гемоглобина в растворе. Еще в 1921 г. Джозеф Баркрофт (J. Barcroft) поставил вопрос: «Не присутствует ли [в эритроцитах] какое-то третье вещество... составляющее интегральную часть кислород-гемоглобинового комплекса?» Действительно, такое вещество есть. В 1967 г. Рейнхолд Бенеш (R. Benesch) и Рут Бенеш (Ruth Benesch) показали, что 2,3-бисфосфоглицерат (БФГ) присоединяется к гемоглобину и тем самым оказывает сильное влияние на его сродство к кислороду. БФГ содержится в эритроцитах примерно в той же молярной концентрации, что и гемоглобин. В отсутствие БФГ P_{50} для гемоглобина составляет 1 торр, как и для миоглобина, в присутствии БФГ P_{50} для гемоглобина становится 26 торр (рис. 4.8). Таким образом, *БФГ снижает сродство гемоглобина к кислороду в 26 раз.* БФГ играет важную роль в физиологии: в отсутствие БФГ гемоглобин, проходя через капилляры тканей, где pO_2 равно ~26 торр, высвобождал бы лишь очень мало O_2.

БФГ влияет на сродство гемоглобина к кислороду путем присоединения к дезоксигемоглобину, но не к оксигемоглобину. Связывание кислорода и связывание БФГ – взаимоисключающие процессы. В определенном приближении оксигенирование гемоглобина в присутствии БФГ выражается следующим уравнением:



$$Hb{-}БФГ + 4O_2 \rightleftarrows Hb(O_2)_4 + БФГ.$$



2,3-бисфосфоглицерат (БФГ)

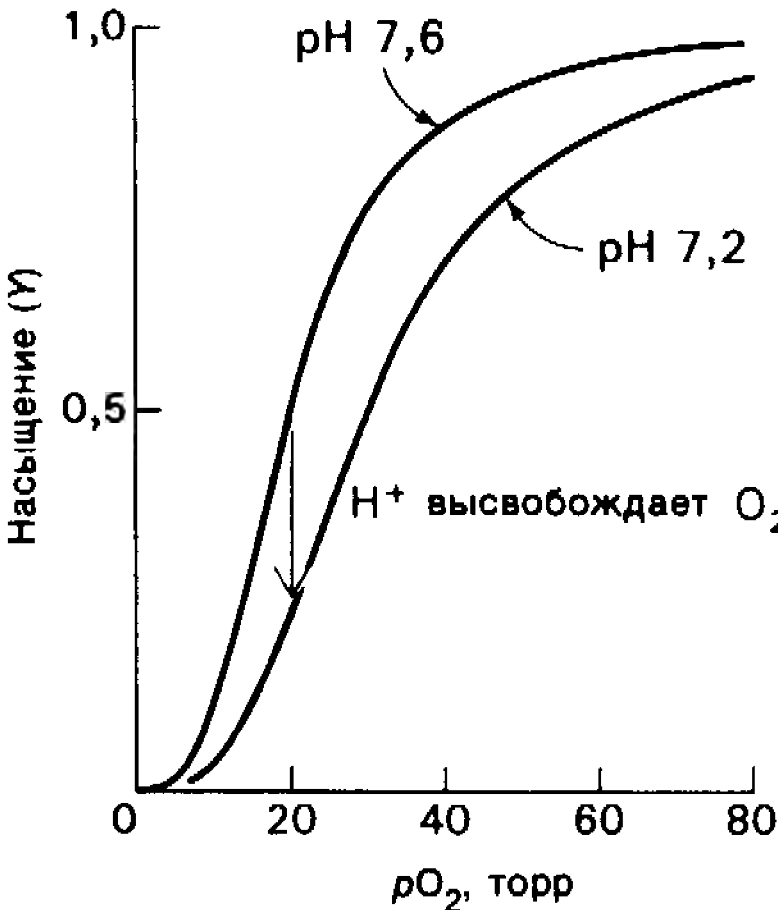


Рис. 4.6. Влияние pH на сродство гемоглобина к кислороду. Снижение pH от 7,6 до 7,2 приводит к высвобождению кислорода из оксигемоглобина.

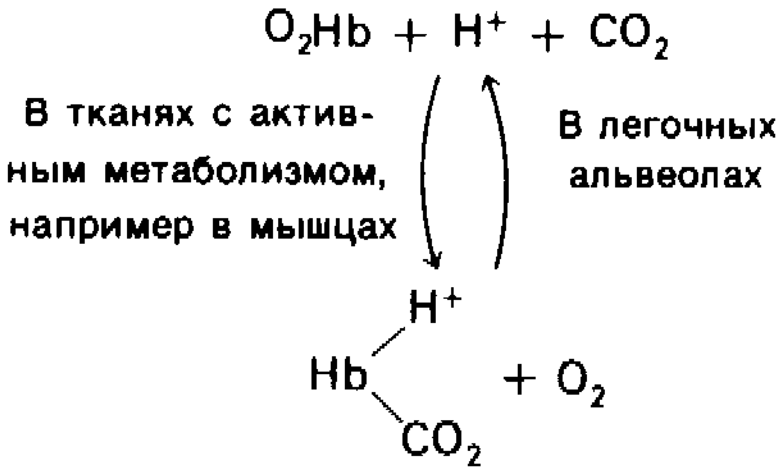


Рис. 4.7. Сущность эффекта Бора. Механизм и стехиометрия процессов представлены в упрощенном виде.

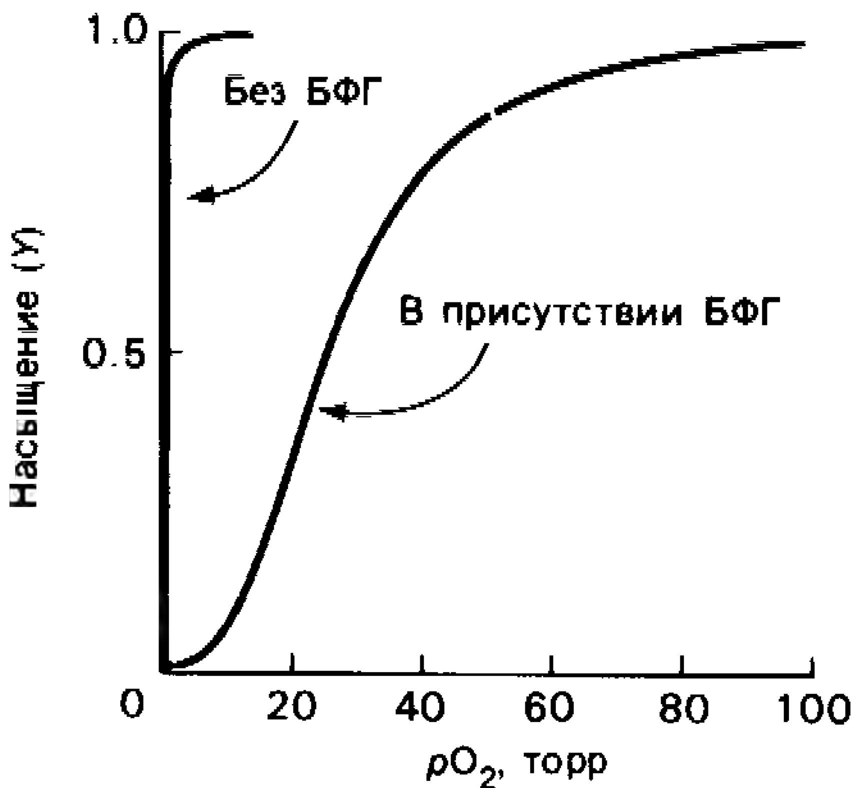
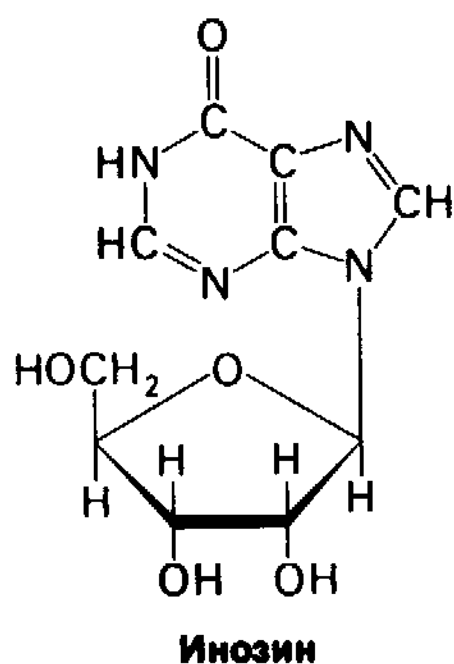


Рис. 4.8. Бисфосфоглицерат снижает сродство гемоглобина к кислороду.

4.6. Клиническое значение биофосфоглицерата

Выявление роли БФГ в транспорте кислорода сыграло важную роль в нескольких областях клинической медицины. Так, например, на протяжении ряда лет оставалось непонятным, почему в крови, консервированной в *среде кислота-цитрат-декстроза (общепринятая для консервирования крови среда), сродство к кислороду возрастает:* P_{50} становится равным 16 вместо 26 торр. Теперь установлено, что повышение сродства к кислороду обусловлено одновременным снижением содержания БФГ с 4,5 до менее чем 0,5 мМ за 10 дней хранения крови. Сродство консервированной крови к кислороду имеет крайне важное значение в клинических условиях. Если больному переливают большое количество крови с высоким сродством к кислороду, то возникает опасность недостаточного снабжения кислородом тканей. Попавшие в кровяное русло эритроциты, полностью лишенные БФГ, восстанавливают половину его нормального содержания за 24 ч. Этот срок может оказаться неприемлемым для тяжелых больных. Таким образом, в определенных условиях следует обращать внимание на то, чтобы при переливании крови больной получил эритроциты с нормальным сродством к кислороду. Добавлением БФГ нельзя повысить его содержание в эритроцитах, так как БФГ, обладая высоким зарядом, не проходит через клеточную мембрану. Можно, однако, предотвратить снижение концентрации БФГ в консервированных клетках, добавляя в среду *инозин.* Незаряженные молекулы инозина проходят через мембрану эритроцита и внутри клетки в результате сложной серии реакций (разд. 15.4) превращаются в БФГ. В настоящее время *инозин* широко используется для сохранения функциональной полноценности консервированной крови.



Инозин

Открытие роли БФГ позволило также понять и некоторые адаптивные механизмы, включающиеся при нарушении снабжения тканей кислородом (т. е. при *гипоксии*). Возьмем для примера больных с тяжелой обструктивной эмфиземой легких. При этом заболевании затруднено поступление воздуха в бронхиолы; в результате артериальная кровь недостаточно насыщается кислородом. pO_2 в артериальной крови таких больных составляет только 50 торр, т. е. оно вдвое ниже, чем в норме. Но при этом происходит компенсаторный сдвиг кривой насыщения кислородом, обусловленный повышением концентрации БФГ с 4,5 до 8,0 мМ. При таком содержании БФГ P_{50} становится равным уже не 26, а 31 торр. При $P_{50} = 31$ торр насыщение кислородом в артериях (Y_A) составляет 0,82, а в венах (Y_V) - 0,49; артерио-венозная разница (ΔY) равна 0,33. При нормальном значении P_{50} ($P_{50} = 26$ торр) $Y_A = 0{,}86$, $Y_V = 0{,}60$ и $\Delta Y = 0{,}26$. Сдвиг кривой диссоциации кислорода создает то преимущество, что увеличивает ΔY с 0,26 до 0,33. Таким образом, повышение концентрации БФГ приводит к увеличению доставки кислорода в ткани на 27%.

При некоторых *нарушениях обмена веществ в эритроцитах* содержание БФГ изменяется, что сопровождается соответственным изменением сродства гемоглобина к кислороду. Эти нарушения обсуждаются в одной из следующих глав (разд. 12.18).

Нерешенной проблемой физиологии дыхания является механизм *адаптации к высоте.* И в этом случае изменение уровня в содержании БФГ имеет, по-видимому, существенное значение. Когда человек поднимается от уровня моря на высоту 4500 м, уже через 2 дня концентрация БФГ в его эритроцитах возрастает с 4,5 до 7,0 мМ и соответственно снижается сродство к кислороду. Насыщение артериальной крови кислородом уменьшается из-за снижения P_{50}, но количество транспортируемого кислорода возрастает (возрастает ΔY), так как больше высвобождается кислорода в капиллярной сети. При спуске с гор на уровень моря концентрации БФГ и P_{50} возвращаются к исходным величинам.

4.7. Гемоглобин плода характеризуется высоким сродством к кислороду

Эмбрионам свойственен особый тип гемоглобина - гемоглобин F ($\alpha_2\gamma_2$), который, как уже упоминалось ранее, отличается от гемоглобина взрослых. Важнейшая особенность гемоглобина F состоит в том, что в физиологических условиях его сродство к кислороду выше, чем сродство к кислороду у гемоглобина А (рис. 4.9). Более высокое сродство к кислороду гемоглобина F создает оптимальные условия для транспорта кислорода из крови матери в кровь плода. Гемоглобин F оксигенируется за счет гемоглобина А (находящегося по другую сторону трансплацентарного барьера в кровеносной системе плаценты).

Высокое сродство крови плода к кислороду известно уже на протяжении многих лет, однако причина этого явления выяснилась лишь недавно. Оказалось, что *гемоглобин F слабее связывает БФГ, чем гемоглобин А, и, следовательно, обладает более высоким сродством к O_2*. В самом деле, в отсутствие БФГ величины сродства этих гемоглобинов располагаются в обратном порядке. Это казалось загадочным до тех пор, пока не выяснилось, что экспериментальное определение кривых диссоциации кислорода следует проводить при добавлении БФГ, поскольку это соединение присутствует в эритроцитах как плода, так и взрослого.

4.8. Для проявления аллостерического эффекта необходимо взаимодействие субъединиц

Рассмотрим структурную основу аллостерических эффектов. Гемоглобин можно расщепить на составляющие его полипептидные субъединицы. Выделенные α-цепи гемоглобина по своим свойствам имеют много общего с миоглобином. Сама по себе α-цепь характеризуется высоким сродством к кислороду, гиперболической кривой диссоциации кислорода и таким связыванием O_2, которое нечувствительно к изменению pH, концентрации CO_2 и содержанию БФГ. Изолированные β-цепи легко образуют тетрамер β_4, называемый гемоглобином Н. Подобно α-цепи и миоглобину, β_4 полностью лишен аллостерических свойств. Отсюда следует, что *аллостерические свойства гемоглобина возникают в результате взаимодействия субъединиц. Функциональная единица гемоглобина - это тетрамер, состоящий из полипептидных цепей двух типов.*

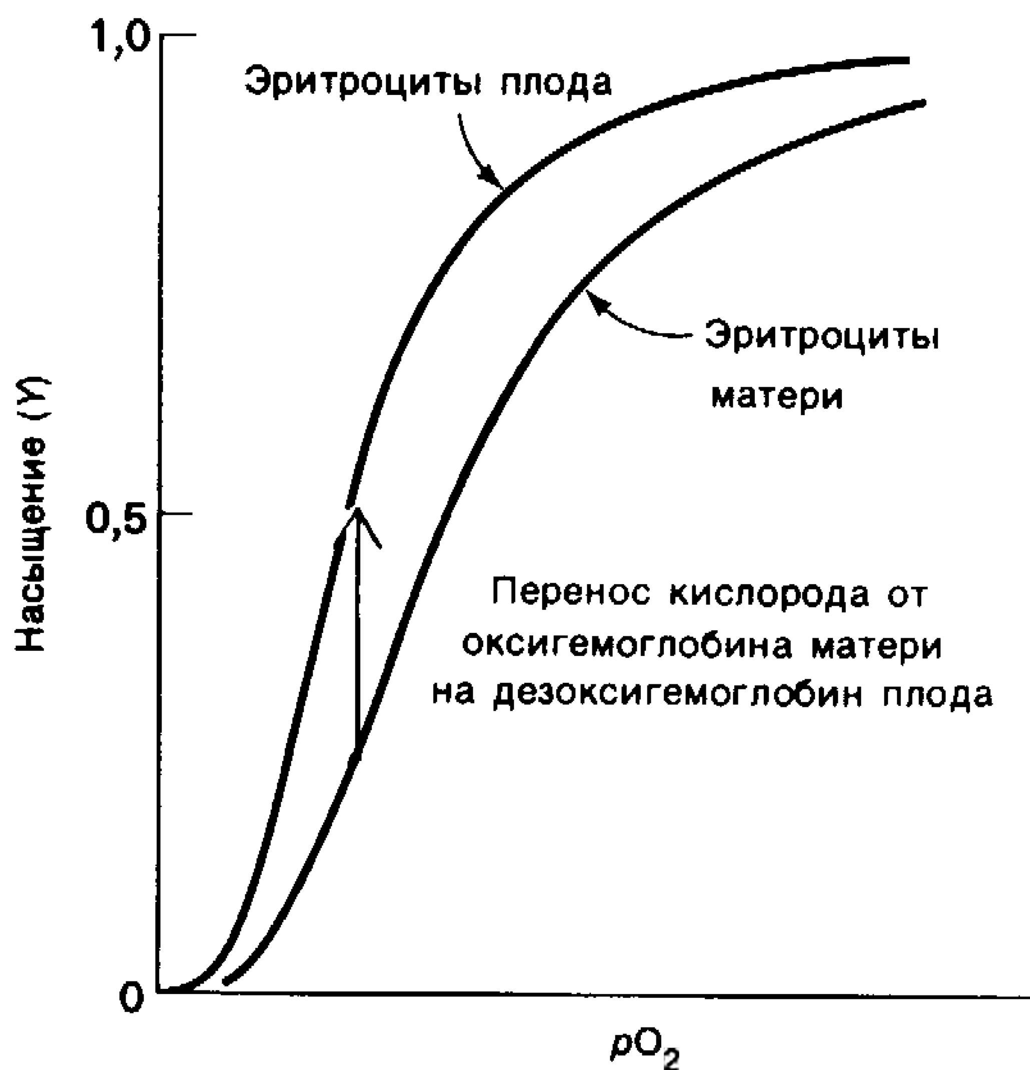


Рис. 4.9. Эритроциты плода обладают более высоким сродством к кислороду, чем эритроциты матери. В присутствии бисфосфоглицерата сродство к кислороду гемоглобина плода выше, чем у гемоглобина матери.

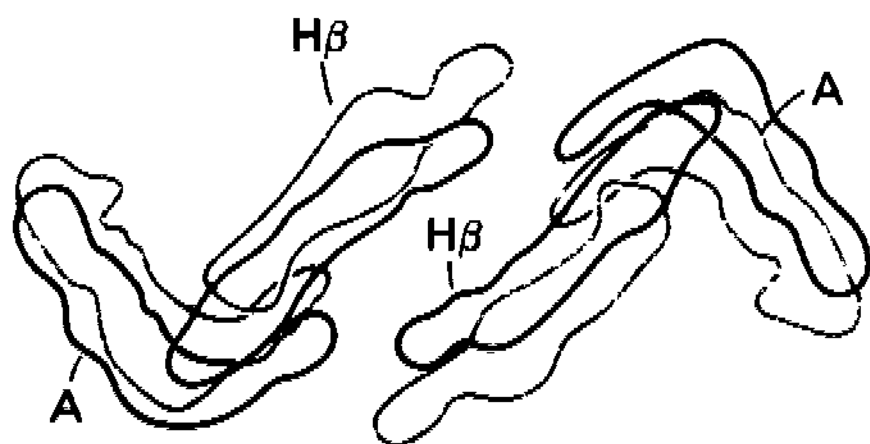


Рис. 4.10. Проекция части карт электронных плотностей оксигемоглобина (красный) и дезоксигемоглобина (синий), полученная при разрешении 5,5 Å. Показаны спирали А и Н двух β-цепей гемоглобина. Центральная часть схемы соответствует центральному углублению в молекуле. Здесь показано одно из конформационных изменений гемоглобина, сопутствующих присоединению кислорода, а именно сближение двух Н-спиралей. [Perutz M.F., Nature, 228, 738 (1970).]

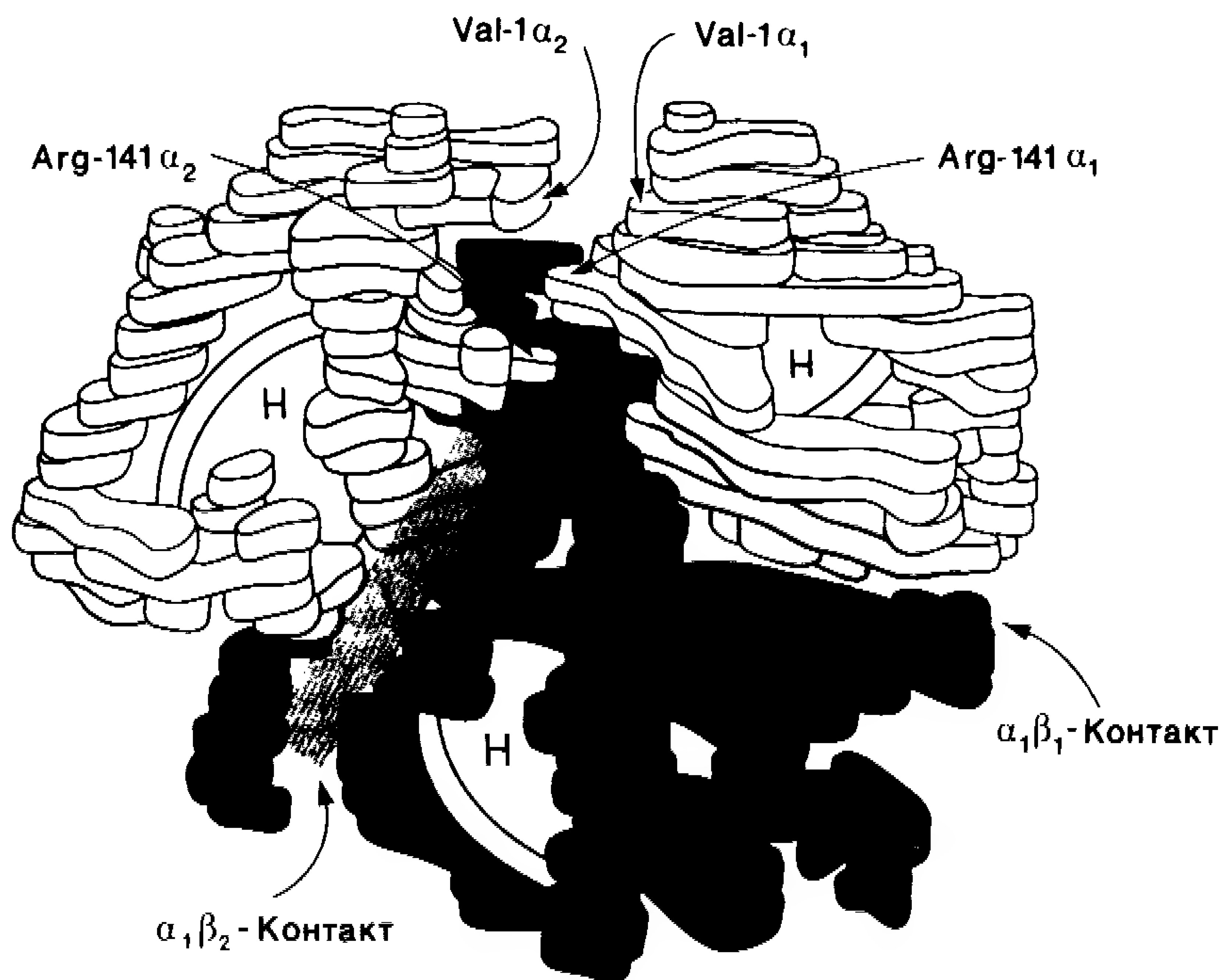


Рис. 4.11. Модель оксигемоглобина при низком разрешении. Показаны два вида контактов между α- и β-цепями. α-Цепи изображены белым, β-цепи – серым. Три гема, видные на модели, обозначены буквой Н. Область $\alpha_2\beta_1$-контактов показана синим, а $\alpha_1\beta_1$-контакта – желтым. [Perutz M.F., TenEyck L.F., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **36**, 196 (1971).]

4.9. Четвертичная структура гемоглобина значительно изменяется при оксигенировании

В 1937 г. Феликс Гауровиц (F. Haurowitz) обнаружил, что кристаллы дезоксигемоглобина при оксигенировании разрушаются. Объясняется это тем, что структура оксигемоглобина заметно отличается от структуры дезоксигемоглобина и оксигенированные молекулы уже не укладываются в кристаллическую решетку дезоксигемоглобина. В противоположность этому на кристаллы миоглобина, так же как и на кристаллы β_4, оксигенирование не влияет.

Как показал рентгеноструктурный анализ, окси- и дезоксигемоглобин существенно различаются по четвертичной структуре (рис. 4.10). Оксигенированная молекула более компактна. Например, при присоединении O_2 расстояние между атомами железа в β-цепях уменьшается с 39,9 до 33,4 Å. Особый интерес представляют изменения в области контактов между α- и β-цепями. Существуют два типа контактов между α- и β-цепями, обозначаемые соответственно $\alpha_1\beta_1$- и $\alpha_1\beta_2$-контактами (рис. 4.11). При переходе гемоглобина из окси- в дезоксиформу $\alpha_1\beta_1$-контакт практически не меняется, тогда как $\alpha_1\beta_2$-контакт претерпевает большие структурные изменения. В результате присоединения кислорода одна пара субъединиц αβ поворачивается относительно другой пары αβ на 15° (рис. 4.12). Некоторые атомы в этой области раздела перемещаются на расстояние, достигающее 6 Å. По существу область контакта $\alpha_1\beta_2$ функционирует как переключатель с одной структуры на другую. Каждая из форм такого похожего на ласточкин хвост контакта стабилизирована собственным набором водородных связей (рис. 4.13).

Контакт $\alpha_1\beta_2$ расположен вблизи гемов. Следовательно, структурные изменения в этой области могут оказывать влияние на гем. Важное значение контакта подтверждается также и тем, что у всех позвоночных он состоит в основном из одних и тех же аминокислотных остатков. Кроме того, практически при всех мутациях, затра-

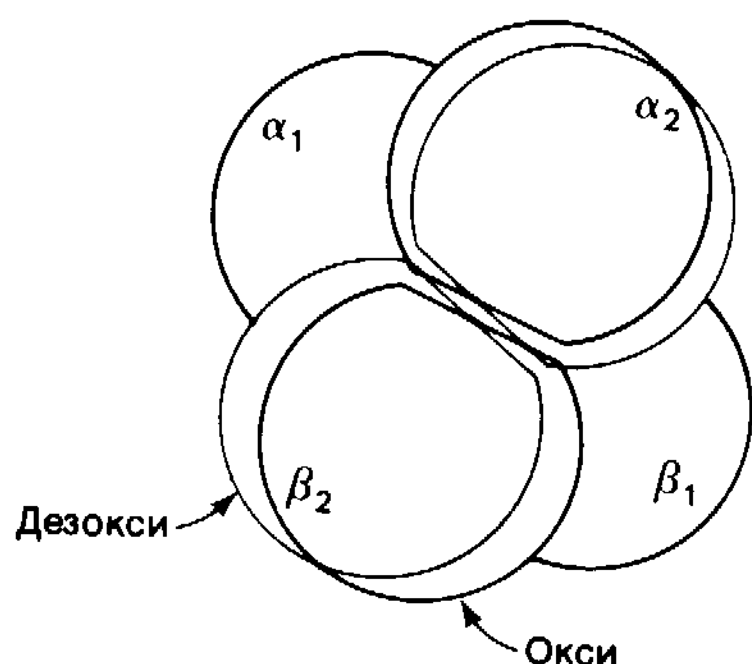


Рис. 4.12. Схема, иллюстрирующая изменения четвертичной структуры гемоглобина при оксигенировании. Одна пара αβ-субъединиц сдвигается по отношению к другой путем поворота на 15° и продвижения на 0,8 Å. Оксиформа повернутой пары αβ-субъединиц показана красным, дезоксиформа – синим. [Baldwin J., Chothia C., J. Mol. Biol., **129**, 192 (19Э9).]

гивающих контакт $\alpha_1\beta_2$, взаимодействие гем—гем оказывается сниженным, тогда как при мутациях контакта $\alpha_1\beta_1$ этого не происходит.

4.10. Солевые связи между отдельными цепями придают жесткость структуре дезоксигемоглобина

В оксигемоглобине С-концевые остатки во всех четырех цепях обладают практически полной свободой вращения. В дезоксигемоглобине, напротив, эти концевые группы заякорены (рис. 4.14). Дело в том, что, во-первых, карбоксильный конец α_1-цепи взаимодействует с аминоконцом α_2-цепи. Во-вторых, боковая цепь аргинина на этом С-конце образует связь с аспартатом α_2-цепи. В-третьих, карбоксильный конец β_1-цепи связан с боковой цепью лизина, принадлежащего α_2-цепи Наконец, имидазольная боковая цепь С-концевого остатка β_1-цепи взаимодействует с боковой цепью аспартата, также принадлежащего β_1-цепи. Эти пары аминокислотных остатков образуют так называемые *солевые связи*, т. е. нековалентные электростатические связи между противоположно заряженными группами. Из-за образования этих восьми солевых связей дезоксигемоглобин имеет более жесткую, напряженную структуру, чем оксигемоглобин.

Четвертичная структура дезоксигемоглобина обозначается как Т-форма (от англ. tense – напряженная), тогда как четвертичная структура оксигемоглобина – как R-форма (от англ. relaxed – релаксированная). Обозначения Т и R обычно используются для описания альтернативных четвертичных структур аллостерических белков, причем Т-форма всегда имеет меньшее сродство к субстрату.

4.11. При оксигенировании атом железа перемещается в плоскость порфирина

Выше речь шла о конформационных изменениях, происходящих на некотором расстоянии от гема. Посмотрим теперь, что

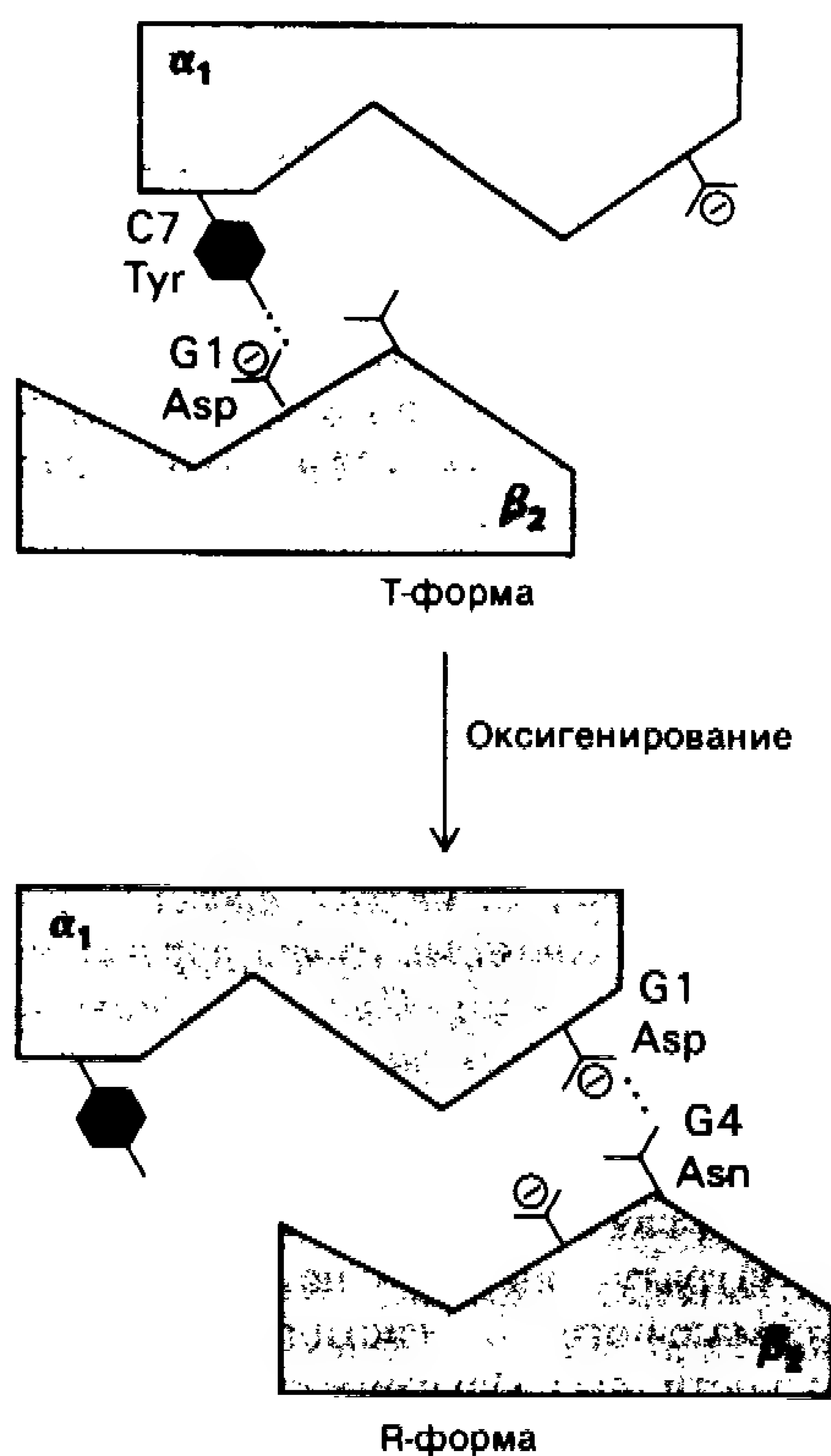


Рис. 4.13. Область $\alpha_1\beta_2$-контакта при оксигенировании переходит от Т-формы к R-форме. Конфигурация контактирующих поверхностей в виде ласточкина хвоста позволяет двум субъединицам легко скользить относительно друг друга.

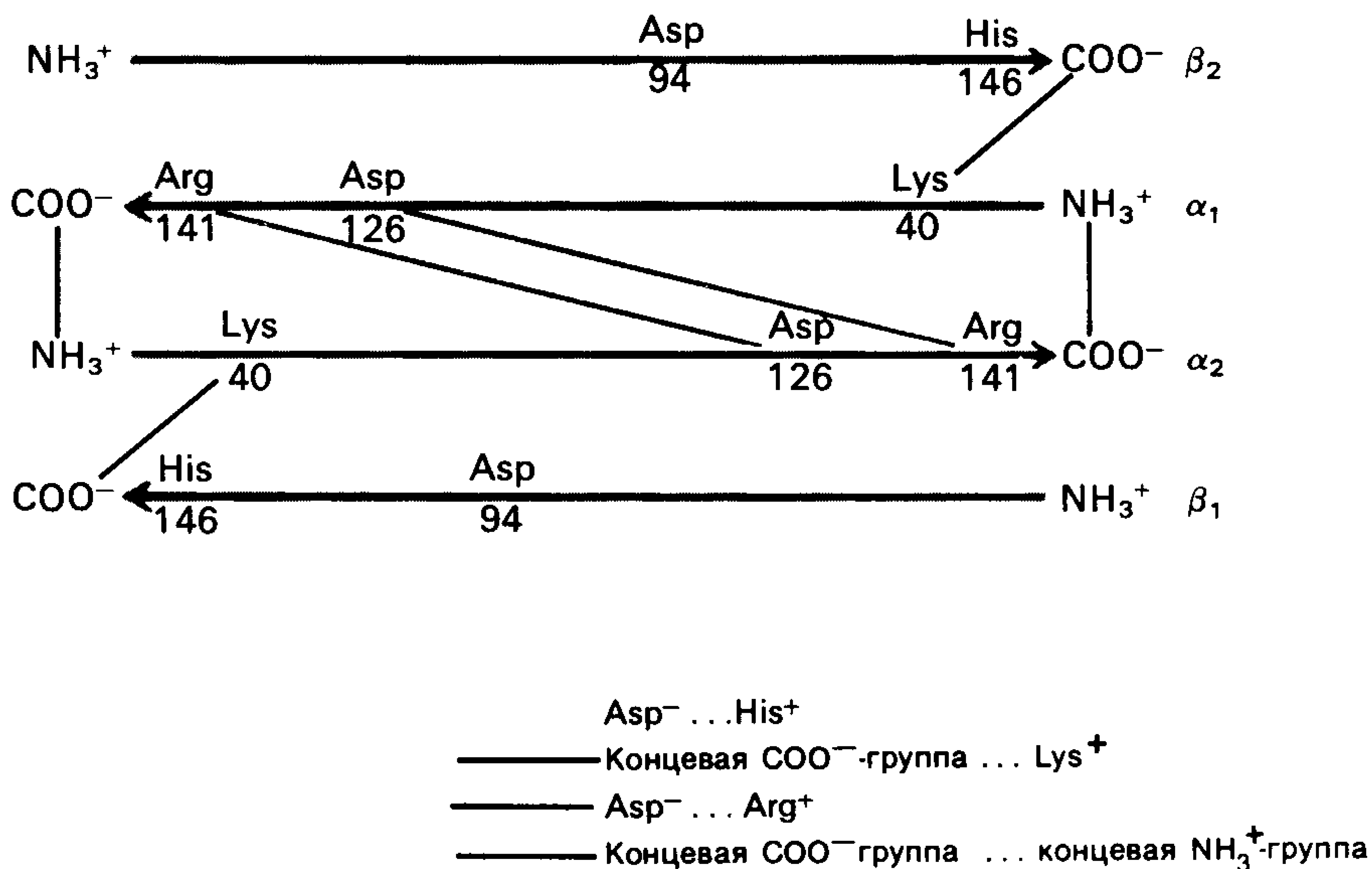


Рис. 4.14. Перекрестные связи между субъединицами в дезоксигемоглобине. При оксигенировании эти нековалентные электростатические связи легко разрываются.

происходит с самим гемом при оксигенировании. *В дезоксигемоглобине атом железа выступает примерно на 0,6 Å из плоскости гема вследствие стерического отталкивания, возникающего между проксимальным гистидином и атомами азота порфиринового кольца* (рис. 4.15). *При оксигенировании атом железа перемещается в плоскость порфирина, образуя прочную связь с O_2.* Прирост энергии, обусловленный формированием этой связи, более чем в 10 раз покрывает затрату энергии на передвижение проксимального гистидина ближе к плоскости гема. Изучение структуры большого числа синтезированных железопорфиринов показало, что в соединениях, где занято 5 координационных положений, атом железа лежит вне плоскости гема, но если заняты все 6 координационных положений, то атом железа находится в плоскости или почти в плоскости гема. Локализация атома железа зависит также от спина его электронов, а именно высокоспиновое состояние способствует расположению вне плоскости.

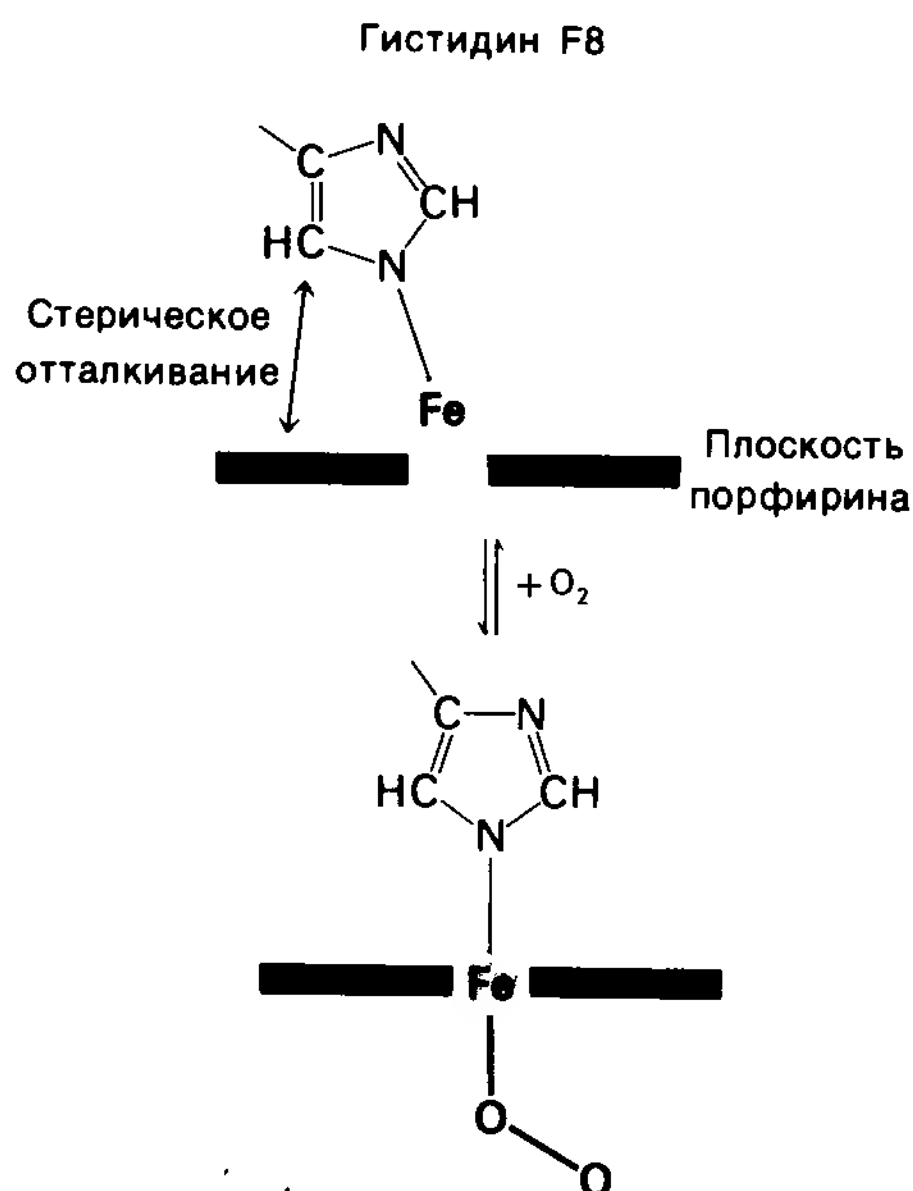


Рис. 4.15. При оксигенировании атом железа перемещается в плоскость гема. Проксимальный гистидин (F8) тянется вслед за атомом железа и становится менее наклоненным. Атом железа исходно не лежит в плоскости гема вследствие стерического отталкивания, возникающего между атомом углерода имидазольного кольца и атомом азота гема.

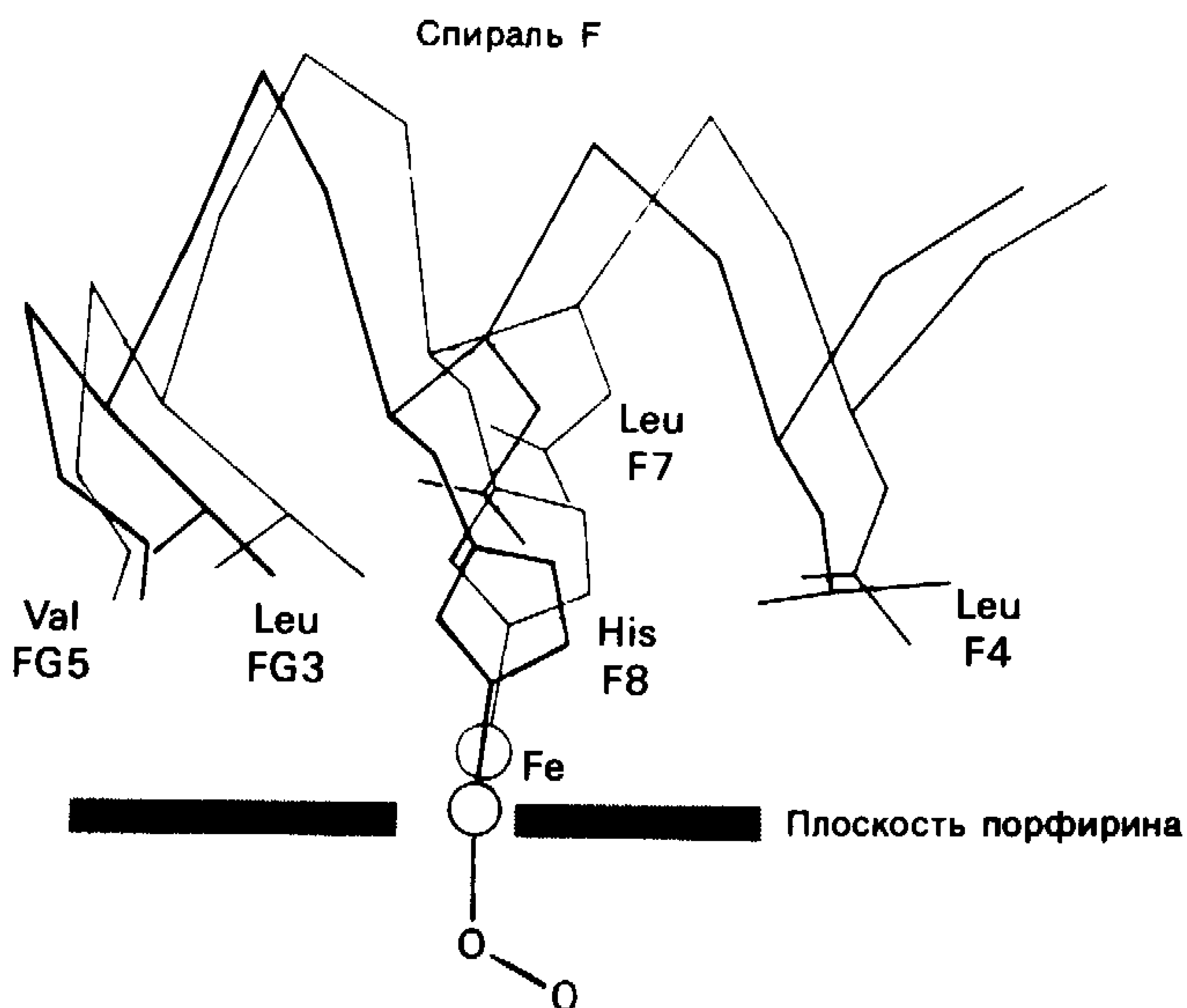


Рис. 4.16. Конформационные изменения, индуцированные движением атома железа при оксигенировании. Проксимальный гистидин притягивается атомом железа и становится менее наклоненным. Оксигенированная структура показана красным, дезоксигенированная – синим. [Baldwin J., Chothia C., Mol. Biol., **129**, 192 (1979).]

4.12. Движение атома железа передается на другие субъединицы через проксимальный гистидин

Каким образом перемещение атома железа в плоскость гема может способствовать переключению четвертичной структуры с T-формы на R? Ключевым элементом в передаче структурных изменений от гема одной субъединицы к другой субъединице служит боковая цепь проксимального гистидина, которую тянет за собой перемещающийся атом железа (рис. 4.16). Гем и проксимальный гистидин образуют тесные контакты с боковыми цепями 15 аминокислотных остатков, и потому при оксигенировании меняются структуры спирали F, углов EF и FG. Эти сдвиги передаются затем на области межсубъединичных контактов. Тирозин HC2, располагавшийся в кармане между спиралями F и H, выдвигается наружу, что приводит к разрыву солевых связей между цепями. В результате равновесие между двумя четвертичными структурами при оксигенировании сдвигается в сторону R-формы. Итак, *изменение структуры внутри одной субъединицы (оксигенирование) приводит к изменению структуры в области контактов субъединиц. Таким путем присоединение кислорода к одному гему передается на отдаленные от этого гема части молекулы.*

4.13. Механизм кооперативного связывания кислорода

Почему четвертая молекула O_2 связывается гемоглобином примерно в 300 раз прочнее, чем первая? Понять это явление можно из аналогии, приведенной на рис. 4.17. Дезоксигемоглобин имеет жесткую структуру, усиленную восемью солевыми связями между четырьмя субъединицами. Присоединение кислорода может произойти лишь после того, как разрыв каких-то из этих связей позволит атому железа переместиться в плоскость гема. Сколько должно разорваться солевых связей, чтобы присоединилась молекула O_2? Это зависит от того, какая по счету молекула должна присоединиться: первая, вторая, третья или четвертая. Для связывания первой молекулы O_2 необходимо разорвать больше связей, чем для связывания последующих. Поскольку разрыв солевых связей требует энергии, присоединение первой молекулы O_2 энергетически менее выгодно, чем присоединение



Рис. 4.17. Пояснение хода оксигенирования гемоглобина на примере почтовых марок. Для того чтобы оторвать одну марку из четырех, нужно разорвать две перфорированные стороны. Чтобы отделить вторую марку, нужно произвести разрыв только с одной стороны; чтобы отделить третью – тоже с одной. После этого четвертая марка остается свободной.

остальных. Присоединение же второй и третьей молекул O_2 по величине затраты энергии занимает промежуточное положение между первой и четвертой (рис. 4.18). Такое постепенное увеличение сродства к кислороду придает кривой связывания O_2 ту сигмоидность формы, которая выявляется экспериментально.

Этот аллостерический механизм можно описать и на уровне более тонкой структуры. Почти все молекулы дезоксигемоглобина находятся в Т-форме. По мере последовательного связывания молекул O_2 возрастает вероятность перехода в R-форму. *Сродство Т-формы к O_2 в 300 раз ниже, чем сродство R-формы, так как в Т-форме передвижение проксимального гистидина в плоскость гема имеет больше ограничений.* В частности, в Т-форме проксимальный гистидин больше наклонен к плоскости гема (см. рис. 4.16), а потому и увеличено стерическое отталкивание, препятствующее его перемещению. Более симметричное положение проксимального гистидина в R-форме облегчает его приближение к гему. Кроме того, в Т-форме участок связывания O_2 в β-субъединице заслонен валином E11 в большей степени, чем в R-форме.

4.14. Бисфосфоглицерат снижает сродство к кислороду путем образования перекрестных связей с дезоксигемоглобином

БФГ специфически связывается с дезоксигемоглобином в соотношении 1 БФГ на 1 тетрамер гемоглобина. Это очень интересная стехиометрия. Казалось бы, белок, имеющий структуру $\alpha_2\beta_2$, должен обладать по крайней мере двумя участками связывания какого бы то ни было небольшого соединения. Наличие только одного участка связывания тотчас же наводит на мысль, что БФГ связывается по оси симметрии молекулы гемоглобина в центральной полости, где схо-

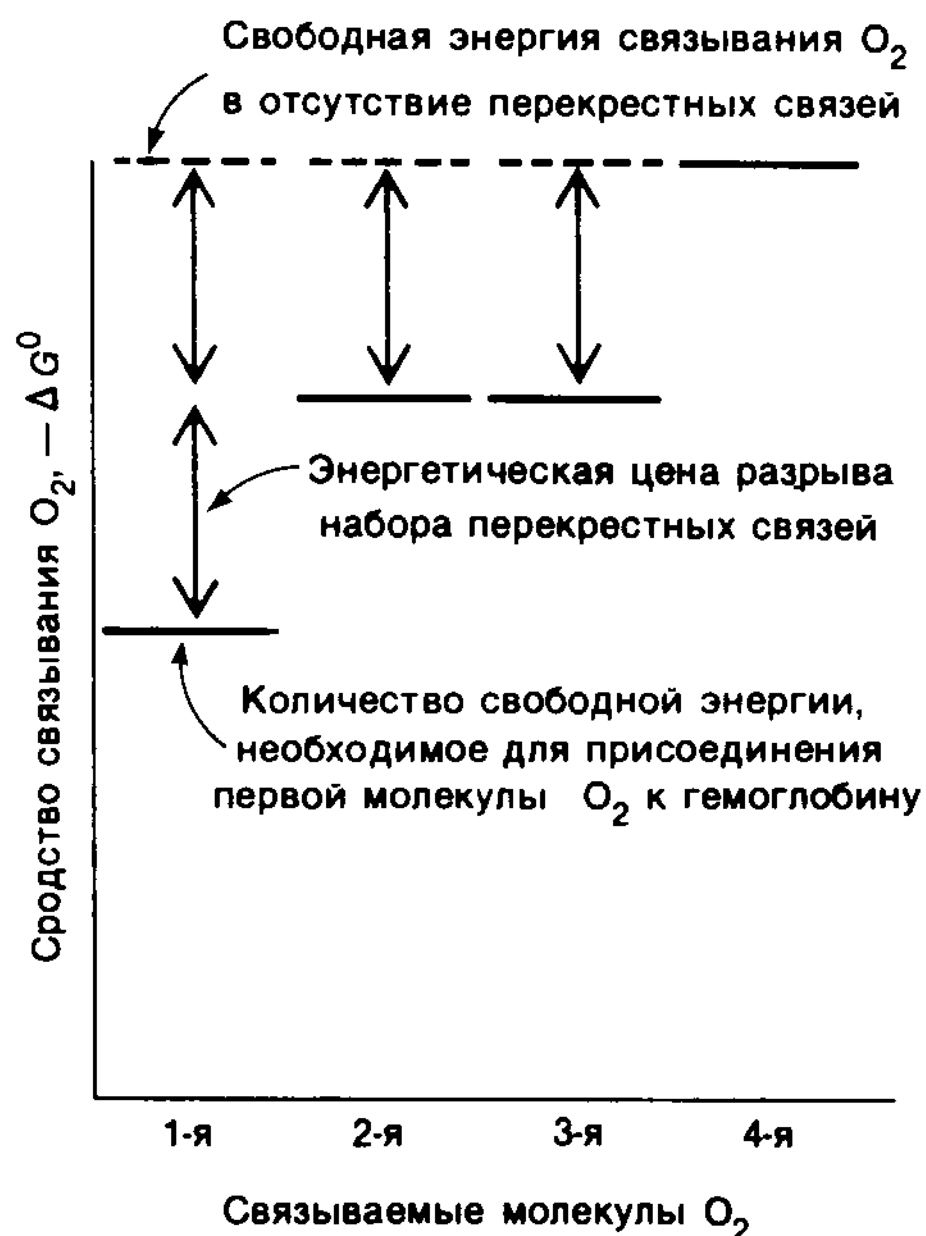


Рис. 4.18. Свободная энергия связи последовательных молекул O_2 (ср. с моделью, описанной на рис. 4.17). Сродство связывания ($-\Delta G^0$) возрастает, так как для присоединения четвертой молекулы O_2 нужно разорвать меньше перекрестных связей, чем для присоединения первой.

дятся 4 субъединицы (рис. 4.19). Участок связывания БФГ образован положительно заряженными остатками, принадлежащими *обеим* β-цепям, а именно: α-аминогруппой, лизином EF6 и гистидином H21. Очевидно, что эти группы легко взаимодействуют с отрицательно заряженным БФГ, имеющим при физиологическом значении pH почти 4 отрицательных заряда. Стереохимически БФГ комплементарен констелляции из 6 положительно заряженных групп β-цепей, обращенных к внутренней полости молекулы гемоглобина (рис. 4.20). Более слабое связывание БФГ гемоглобином плода по сравнению с гемоглобином A объясняется тем, что у гемоглобина плода в положении H21 находится серин, а не гистидин.

При оксигенировании БФГ отщепляется, поскольку центральная полость становится слишком мала. В частности, сужается промежуток между H-спиралями β-цепей. Кроме того, расстояние между α-аминогруппами возрастает с 16 до 20 Å, вследствие чего исчезает контакт между ними и фосфатными группами БФГ.

Теперь нам понятно, почему БФГ снижает сродство к кислороду. *Образуя перекрестные связи с β-цепями, БФГ стабилизирует четвертичную структуру дезоксигемоглобина.* Другими словами, БФГ сдвигает равновесие в сторону T-формы. Как уже упоминалось, в дезоксигемоглобине имеется 8 солевых связей, заякоривающих его концевые карбоксильные остатки. Для того чтобы произошло оксигенирование, эти солевые связи необходимо разорвать. Присоединение БФГ создает дополнительные солевые связи, которые должны быть разорваны. В итоге сродство гемоглобина к кислороду при присоединении БФГ оказывается сниженным.

4.15. CO_2 присоединяется к концевым аминогруппам гемоглобина, снижая его сродство к кислороду

У аэробных организмов на одну молекулу потребленного O_2 образуется примерно 0,8 молекулы CO_2. Большая часть CO_2 транспортируется кровью в виде *бикарбоната*, который образуется в эритроцитах под действием *карбоангидразы:*



$$CO_2 + H_2O \rightleftarrows HCO_3^- + H^+.$$

Значительная часть H^+, высвобождающегося в этой реакции, присоединяется к дезоксигемоглобину и таким образом участвует

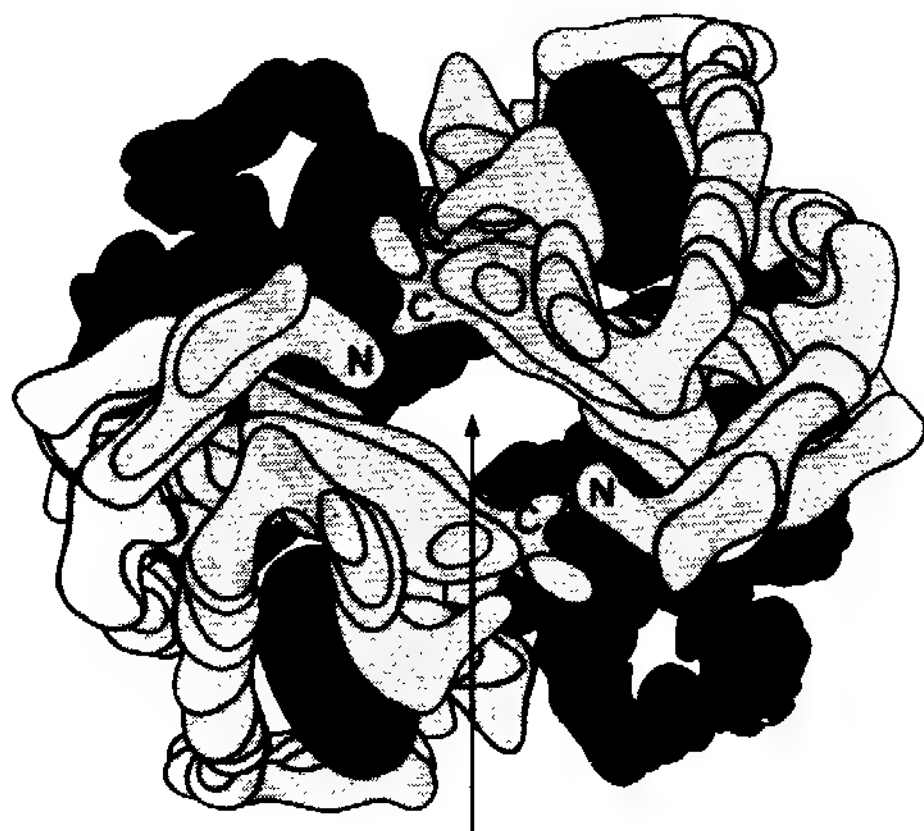


Рис. 4.19. Участок связывания бисфосфоглицерата в центральном углублении молекулы дезоксигемоглобина. (Perutz M.F. The hemoglobin molecule, 1964.)

в эффекте Бора. Кроме того, CO_2 транспортируется гемоглобином в форме *карбамата.* В основе этого процесса лежит обратимая реакция между находящимися в неионизированной форме α-аминогруппами гемоглобина и CO_2:



$$R{-}NH_2 + CO_2 \rightleftarrows R{-}NHCOO^- + H^+$$

Связанные карбаматы образуют солевые мостики, которые стабилизируют T-форму. *Отсюда следует, что присоединение CO_2 снижает сродство гемоглобина к кислороду.* И наоборот, CO_2 более прочно связывается с дезоксигемоглобином, чем с оксигемоглобином.

4.16. Механизм эффекта Бора

Каким образом гемоглобин связывает протоны при своем превращении из окси- в дезоксиформу? Очевидно, при этом превращении должно возрастать сродство определенных участков к H^+. В частности, при превращении из окси- в дезоксиформу должно *увеличиваться* значение p*K* отдельных групп, поскольку увеличение p*K* означает более сильное связывание H^+. Гемоглобин связывает около 0,5 H^+ в расчете на одну высвободившуюся молекулу O_2. Это присоединение H^+ позволяет поддерживать по-

6-665

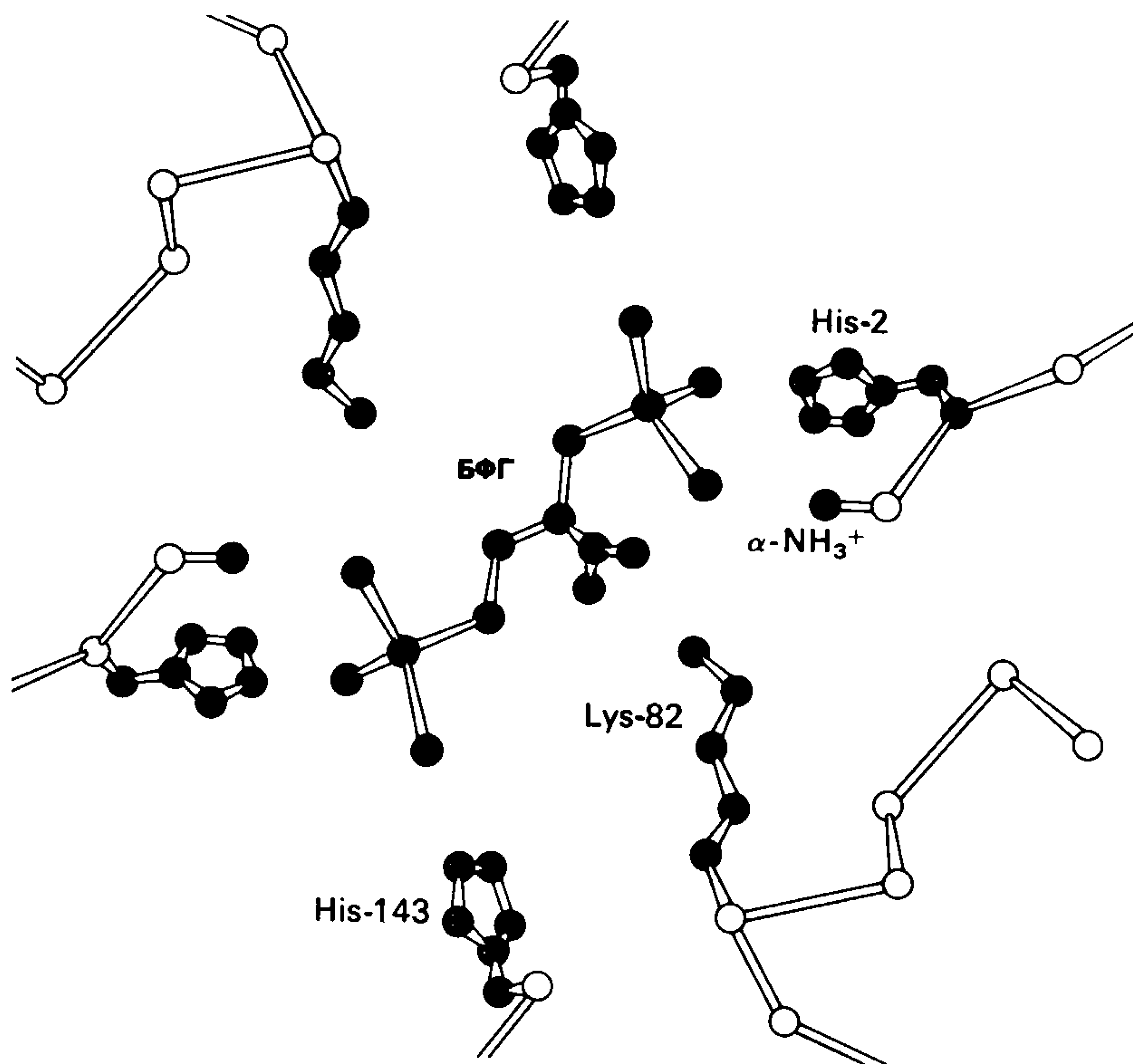


Рис. 4.20. Способ связи БФГ с дезоксигемоглобином человека. Бисфосфоглицерат взаимодействует с тремя положительно заряженными группами в каждой β-цепи. [Arnone A., Nature, **237**, 148 (1972).]

стоянство pH в тканях с активным метаболизмом.

У каких конкретных групп повышается значение p*K*? Рассмотрим сначала возможные участки связывания H^+ в гемоглобине (рис. 4.21 и табл. 4.1) и затем сузим круг выбора. Значения p*K* карбоксильных групп боковой цепи глутамата и аспартата составляют обычно ~ 4. Маловероятно, что их p*K* возрастут до 7–8 – условие, необходимое для участия в эффекте Бора. Подобным же образом маловероятно, что значения p*K* боковых цепей тирозина, лизина и аргинина могут быть сдвинуты в достаточной мере, поскольку обычно их p*K* превышает 10. Отсюда следует, что эффект Бора может быть обеспечен участием гистидина, цистеина и концевой аминогруппы, так как нормальные значения p*K* этих групп лежат в области 7.

Путем сопоставления данных химического и рентгеноструктурного анализа удалось идентифицировать специфические группы, ответственные за эффект Бора. Рентгеноструктурный анализ указывал на вовлечение в эффект Бора остатков гистидина, расположенных на С-конце каждой из β-цепей гемоглобина (гистидин-146β). Справедливость этого предположения была проверена следующим путем. Был получен гемоглобин, β-цепи которого не содержали гистидина-146. Этого удалось достичь путем использования карбоксипептидазы В – специфического протеолитического фермента, расщепляющего в некоторых полипептидных цепях пептидную связь, образованную концевой аминокислотой основного характера, расположенной на С-конце пептида, т. е. содержащей свободную карбоксильную группу. Такая модификация гемоглобина приводила к снижению эффекта Бора в два раза. Отсюда следует, что *гистидин-146 обеих β-цепей вносит, по-видимому, основной вклад в эффект Бора.*

Роль концевых аминогрупп гемоглобина в эффекте Бора была убедительно доказана следующим образом. Концевые аминогруппы модифицировали обработкой циа-

Таблица 4.1. **Значения р*K* ионизируемых групп в белках**

Группа	Кислота ⇄ Основание + H^+	Типичное значение р*K*
Концевой карбоксил	$—COOH \rightleftarrows —COO^- + H^+$	3,1
Аспарагиновая и глутаминовая кислоты	$—COOH \rightleftarrows —COO^- + H^+$	4,4
Гистидин	имидазол-NH^+ (N–H) ⇄ имидазол-N (N–H) + H^+	6,5
Концевая аминогруппа	$—NH_3 \rightleftarrows —NH_2 + H^+$	8,0
Цистеин	$—SH \rightleftarrows —S^- + H^+$	8,5
Тирозин	$—C_6H_4—OH \rightleftarrows —C_6H_4—O^- + H^+$	10,0
Лизин	$—NH_3^+ \rightleftarrows —NH_2 + H^+$	10,0
Аргинин	$—NH—C(=NH_2^+)NH_2 \rightleftarrows —NH—C(=NH)NH_2 + H^+$	12,0

натом, приводящей к образованию *карбамоилпроизводного*, не способного более связывать H^+. Если карбамоилировали концевые аминогруппы только β-цепей, то эффект Бора сохранялся полностью. Если модификации подвергались концевые аминогруппы также и α-цепей, то эффект Бора существенно уменьшался.

Рентгеноструктурный анализ дает конкретную картину участия этих групп в обеспечении эффекта Бора. В оксигемоглобине гистидин-146β свободно вращается, а в дезоксигемоглобине этот концевой остаток участвует в ряде взаимодействий. Особенно важное значение имеет взаимодействие имидазольного кольца этого гистидина с отрицательно заряженным аспартатом-94 в той же β-цепи. Непосредственная близость этой отрицательно заряженной группы повышает вероятность связывания протона гистидином (рис. 4.22). Другими словами, близость аспартата-94 повышает р*K* гистидина -146. Таким образом, *при переходе от окси- к дезоксигемоглобину гистидин-146 приобретает большее сродство к* H^+ *вследствие локального изменения заряда в его непосредственном окружении.*

$$R—NH_2 + {}^-NCO + H^+ \longrightarrow R—NH—C(=O)—NH_2$$

Концевая аминогруппа **Цианат** **Карбамоил-производное**

Аналогичным образом изменяется при дезоксигенировании окружение концевых аминогрупп α-цепей. В оксигемоглобине эти группы свободны. В дезоксигемоглобине концевая аминогруппа одной α-цепи взаи-

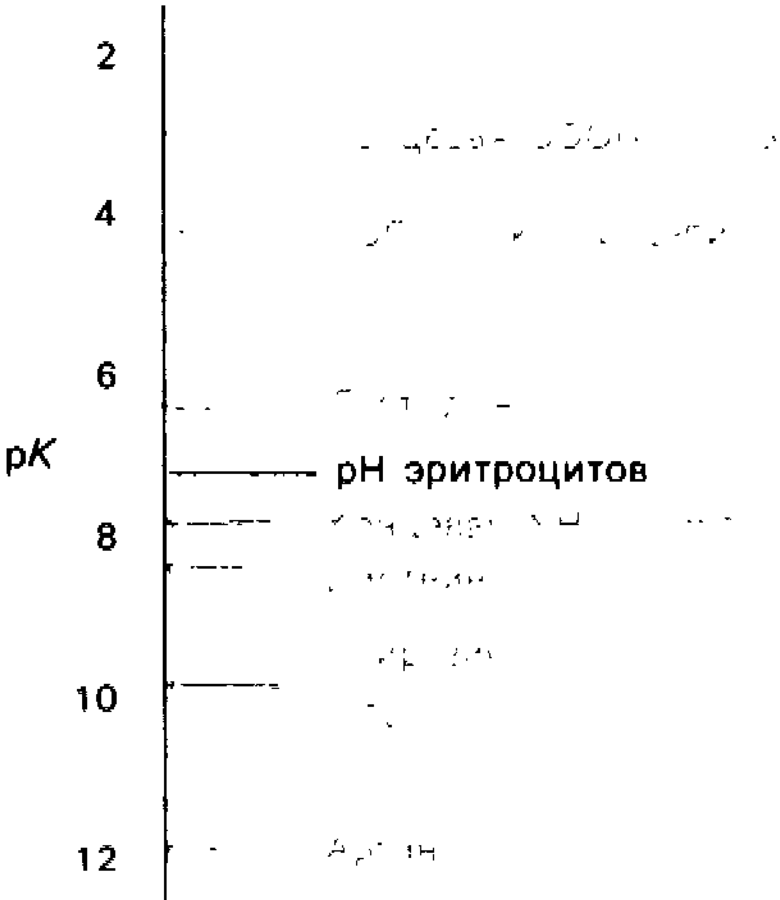


Рис. 4.21. Типичные величины р*K* кислотных групп белков. Окружение отдельной группы может изменить ее реальную величину р*K* в сторону повышения или понижения.

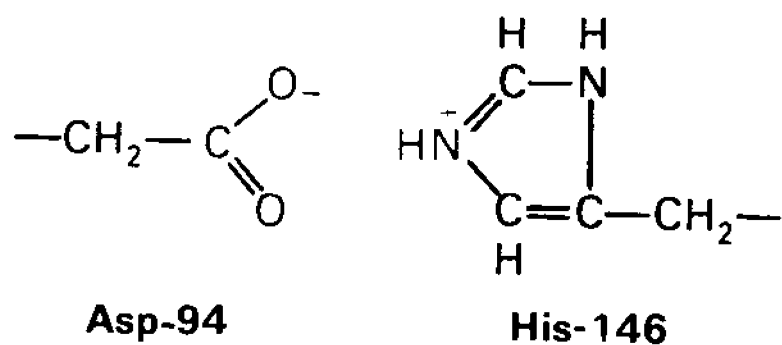


Рис. 4.22. Аспартат-94 повышает р*K* гистидина-146 в дезоксигемоглобине, но не в оксигемоглобине. Близость отрицательного заряда на аспартате-94 способствует протонированию гистидина-146 в дезоксигемоглобине.

модействует с концевой карбоксильной группой другой α-цепи. *Близость отрицательно заряженного карбоксилированного остатка в дезоксигемоглобине повышает сродство этой концевой аминогруппы к H^+.* Данные рентгеноструктурного анализа свидетельствуют о том, что в эффекте Бора участвует и третья группа, а именно гистидин-122 в α-цепи.

Итак, окружение трех пар групп, связывающих протоны (концевая аминогруппа и два гистидина) в окси- и дезоксигемоглобине неодинаково. В дезоксигемоглобине это локальное окружение заряжено более отрицательно. В результате при высвобождении кислорода эти группы связывают H^+.

4.17. Коммуникация внутри белковой молекулы

Как мы видели, связывание гемоглобином O_2, H^+, CO_2 и БФГ находится в определенной взаимосвязи. Эти молекулы присоединяются к пространственно разобщенным участкам, коммуникация между которыми опосредована конформационными изменениями внутри белка. Наличие раздельных участков связывания для этих молекул объясняется тем, что различна структура самих связываемых молекул. *Взаимодействия между разными участками связывания опосредованы изменениями четвертичной структуры.* В сущности все известные аллостерические белки состоят из двух и более полипептидных цепей. Область контакта между двумя цепями способна усиливать и передавать конформационные сдвиги от одной субъединицы к другой. У аллостерического белка нет строго определенных свойств. Напротив, его функциональные свойства зависят от наличия в окружающей среде определенных молекул. Отсюда следует, что аллостерические взаимодействия имеют колоссальное значение для функции клеток. Таким образом, *эволюционный переход от миоглобина к гемоглобину привел к появлению структуры, способной воспринимать информацию из окружающей среды.*

Заключение

Тетрамерный гемоглобин обладает новыми свойствами, которых нет в мономерном миоглобине. Помимо способности транспортировать O_2 гемоглобин способен переносить также H^+ и CO_2. Более того, присоединение последних регулируется аллостерическими сдвигами, которые представляют собой взаимодействия между пространственно разобщенными участками, обусловленные конформационными изменениями белка. Гемоглобин – наиболее изученный аллостерический белок. У гемоглобина проявляются три аллостерических эффекта. Во-первых, кривая связывания кислорода гемоглобином имеет сигмоидную форму, что свидетельствует о кооперативности связывания кислорода. Присоединение кислорода к одному гему облегчает присоединение O_2 к остальным гемам той же молекулы белка. Эта кооперативность увеличивает количество транспортируемого кислорода. Во-вторых, H^+ и CO_2 способствуют отщеплению кислорода от гемоглобина – эффект, имеющий большое физиологическое значение, поскольку таким путем увеличивается высвобождение кислорода в тканях с активным метаболизмом, например в работающих мышцах. Имеет место и обратный эффект: O_2 способствует высвобождению H^+ и CO_2 в капиллярах легочных альвеол. Аллостерическая связь между присоединением H^+, CO_2 и O_2 известна как «эффект Бора». В-третьих, сродство гемоглобина к O_2 регулируется также 2,3-бисфосфоглицератом (БФГ) – соединением небольшой молекулярной массы, имеющим отрицательный заряд высокой плотности. БФГ способен присоединяться к дезоксигемоглобину, но не к оксигемоглобину. Отсюда следует, что БФГ снижает сродство гемоглобина к кислороду. БФГ играет важную роль в адаптации организма к высоте и к гипоксии. Гемоглобин плода обладает более высоким сродством к кислороду, чем гемоглобин взрослого организма, потому что он

связывает меньше БФГ.

Аллостерические свойства гемоглобина обусловлены взаимодействием его α- и β-субъединиц. Жесткость Т-формы (напряженной) четвертичной структуры определяется образованием солевых связей между субъединицами, что обусловливает низкое сродство к кислороду. В R-форме эти межсубъединичные связи отсутствуют и сродство к кислороду высокое. При оксигенировании атом железа перемещается в плоскость гема и подтягивает за собой проксимальный гистидин. При этом перемещении начинают расщепляться солевые связи и происходит сдвиг равновесия от Т-формы к R-форме. Присоединение к гемоглобину четвертой молекулы O_2 происходит значительно легче, чем присоединение первой, так как требует разрыва меньшего числа солевых связей. БФГ связывается с положительно заряженными группами двух β-цепей, окружающими центральную полость гемоглобина. Связывание БФГ стабилизирует Т-форму и потому снижает сродство гемоглобина к кислороду. Другой аллостерический эффектор – диоксид углерода – присоединяется к концевым аминогруппам всех четырех цепей, образуя легко расщепляемую карбаматную связь. Для ионов водорода, также участвующих в возникновении эффекта Бора, имеются три пары участков связывания. Ближайшее окружение двух концевых аминогрупп и двух пар гистидиновых боковых цепей в дезоксигемоглобине обладает бóльшим отрицательным зарядом, чем в оксигемоглобине, и потому после отщепления O_2 к этим участкам присоединяется H^+. CO_2 и H^+, подобно БФГ, снижают сродство к кислороду путем стабилизации Т-формы гемоглобина.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Perutz M.F., 1964. The hemoglobin molecule, Sci. Amer., **211** (11), 2–14. (Увлекательное описание рентгеноструктурных исследований гемоглобина, проведенных* до 1964 г.)

Perutz M.F., 1978. Hemoglobin structure and respiratory transport, Sci. Amer., **239** (6), 92–125. (Взгляд на гемоглобин 14 лет спустя. В этой превосходной статье описываются структурные основы аллостерических свойств гемоглобина.)

Обзоры и монографии

Perutz M.F., 1979. Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron, Ann. Rev. Biochem., **48**, 327–386.

Bauer C., 1974. On the respiratory function of hemoglobin, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., **70**, 1–29.

Bunn H.F., Forget B.G., Ranney H.M., 1977. Human Hemoglobins, Saunders.

Garby L, Meldon J., 1977. The Respiratory Functions of Blood, Plenum.

Antonini E., Brunori M., 1971. Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands, North-Holland.

Эффект Бора и действие бисфосфоглицерата

Kilmartin J.V., Rossi-Bernardi L., 1973. Interaction of hemoglobin with hydrogen ions, carbon dioxide, and organic phosphates, Physiol. Rev., **53**, 836–890.

Kilmartin J.V., 1976. Interaction of haemoglobin with protons, CO_2, and 2,3-diphosphoglycerate, Brit. Med. Bull., **32**, 209–222.

Benesch R., Benesch R.E., 1969. Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by haemoglobin, Nature, **221**, 618 622.

Lenfant C., Torrance J.D., Woodson R.D., Jacobs P., Fenich C.A., 1970. Role of organic phosphates in the adaptation of man to hypoxia, Fed. Proc., **29**, 1115–1117.

Tyuma I., Shimizu K., 1970. Effect of organic phosphates on the difference in oxygen affinity between fetal and adult human hemoglobin, Fed. Proc., **29**, 1112–1114.

Morpurgo G., Arese P., Bosia A., Pescarmona G.P., Luzzana M., Modiano G., Ranjet S.K., 1976. Sherpas living permanently at high altitude: a new pattern of adaptation, Proc. Nat. Acad. Sci., **73**, 747–751.

Механизм аллостерических взаимодействий

Perutz M.F., 1970. Stereochemistry cooperative effects of haemoglobin, Nature, **228**, 726–739. (Изложена заманчивая гипотеза относительно природы аллостерических свойств гемоглобина.)

Hopfield J.J., 1973. Relationship between structure, cooperativity, and spectra in a model of hemoglobin action, J. Mol. Biol., **77**, 207–222.

Gelin B.R., Karplus M., 1977. Mechanism of tertiary structural change in hemoglobin, Proc. Nat. Acad. Sci., **74**, 801 805.

Baldwin J., Chothia C., 1979. Hemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism, J. Mol. Biol., **129**, 175–220.

Вопросы и задачи

1. Как повлияет каждое из перечисленных воздействий на сродство гемоглобина А к кислороду in vitro:

а) увеличение pH от 7,2 до 7,4;
б) увеличение pCO_2 с 10 до 40 торр;
в) увеличение [БФГ] с $2 \cdot 10^{-4}$ до $8 \cdot 10^{-4}$ М;

г) диссоциация $\alpha_2\beta_2$ на мономерные субъединицы?

2. Как повлияют следующие воздействия на количество ионов H^+, связываемых гемоглобином А in vitro:

а) увеличение pO_2 с 20 до 100 торр (при постоянных pH и pCO_2);

б) реакция гемоглобина с избытком цианата (при постоянном pH)?

3. В эритроцитах птиц и черепах содержится регуляторное соединение, отличное от БФГ. Это соединение способно также снижать сродство к кислороду человеческого гемоглобина, освобожденного от БФГ. Какое из нижеперечисленных веществ может быть, по вашему мнению, наиболее эффективным в этом качестве:

а) глюкозо-6-фосфат;

б) инозитолгексафосфат;

в) HPO_4^{2-};

г) малонат;

д) аргинин;

е) лактат?

4. Кривая диссоциации кислорода для гемоглобина описывается с хорошей степенью приближения следующим эмпирически найденным уравнением:

$$Y = \frac{(pO_2)^n}{(pO_2)^n + (P_{50})^n},$$

где $n = 2{,}8$. Вывод этого уравнения был описан в разд. 4.2.

а) Количество транспортированного кислорода пропорционально разнице в степени насыщения ΔY. Рассчитайте ΔY для молекулы гемоглобина, прошедшего путь от легкого до работающей мышцы. Пусть $P_{50} = 26$ торр, $P_{легкое} = 100$ торр, $P_{мышца} = 20$ торр.

б) Допустим, что связывание кислорода гемоглобином происходит некооперативно, но P_{50} остается равным 26 торр. Чему будет равно ΔY для такого некооперативного переносчика кислорода?

5. рK кислоты зависит частично от окружающей ее среды. Какое влияние на рK боковой цепи глутаминовой кислоты окажут следующие факторы?

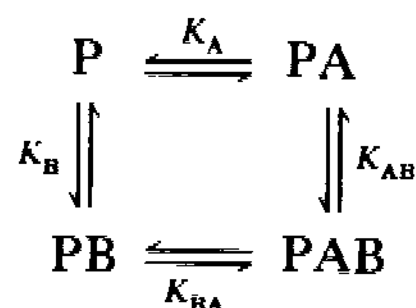
а) тесное сближение с боковой цепью лизина;

б) тесное сближение с концевой карбоксильной группой белка;

в) перемещение боковой цепи глутаминовой кислоты с поверхности белковой молекулы во внутренний неполярный участок?

6. Было измерено сродство к кислороду «огороженных» заместителями железопорфиринов с различными основаниями в пятом координационном положении. С 1-метилимидазолом P_{50} оказалась равным 0,49 торр, тогда как с 1,2-диметилимидазолом – 38 торр. Почему одна дополнительная метильная группа так сильно снижает сродство к кислороду?

7. Представление об образовании связи лежит в основе понимания многих биохимических процессов. Рассмотрим белок P, который способен присоединять вещества А и В вместе или порознь:



Константы диссоциации этих равновесных процессов определяются следующим образом:

$$K_A = \frac{[P][A]}{[PA]}, \quad K_{BA} = \frac{[PB][A]}{[PAB]},$$

$$K_B = \frac{[P][B]}{[PB]}, \quad K_{AB} = \frac{[PA][B]}{[PAB]}.$$

а) Допустим, что $K_A = 5 \cdot 10^{-4}$ М, $K_B = 10^{-3}$ М, $K_{BA} = 10^{-5}$ М. Можно ли на этом основании высчитать четвертую константу диссоциации K_{AB}? Если да, то чему она равна?

б) Как влияет А на связывание В? Как влияет В на связывание А?

8. При присоединении к гемоглобину оксида углерода образуется СО-гемоглобин. Кристаллы СО-гемоглобина изоморфны кристаллам оксигемоглобина. Каждый гем в гемоглобине способен связать одну молекулу оксида углерода, но не может связать одновременно СО и O_2. Сродство связывания СО примерно в 200 раз выше, чем сродство связывания O_2. В результате вдыхания в течение 1 ч воздуха, содержащего 0,1% СО, примерно половина гемов

в гемоглобине оказывается связана с CO, что нередко приводит к летальному исходу. Холдейн и Пристли (Haldane, Priestly) в 1935 г. поставили (и частично разрешили) интересный вопрос:

«Если бы действие CO состояло только в уменьшении способности гемоглобина к переносу кислорода и не влияло на другие его свойства, то симптомы отравления угарным газом трудно было бы объяснить в свете имеющихся данных. Так, как мы только что видели, при полунасыщении крови оксидом углерода больной практически безнадежен; с другой стороны, если у человека содержание гемоглобина просто уменьшается в два раза вследствие анемии, то такой больной может продолжать работать как обычно».

Как объяснить этот кажущийся парадокс?

9. Белок P способен обратимо связывать низкомолекулярное соединение L. Константа диссоциации K для равновесного процесса



$$P + L \rightleftarrows PL$$

составляет

$$K = \frac{[P][L]}{[PL]}.$$

Белок P переносит это соединение из области высокой концентрации $[L_A]$ в область низкой концентрации $[L_B]$. Допустим, что концентрация соединения L в свободной форме остается постоянной. Белок P циркулирует между A и B.

а) Пусть $[L_A] = 10^{-4}$ M и $[L_B] = 10^{-6}$ M. При каком значении K транспорт L окажется максимальным? Для решения задачи составьте уравнение для ΔY, т. е. для изменения степени насыщения связывающего лиганд участка при переходе от A к B. Далее выразите K через ΔY.

б) Рассмотрите аналогичным образом перенос кислорода гемоглобином. При какой величине P_{50} окажется максимальной ΔY? Примем, что P в легких равно 100 торр, P в капиллярах тканей – 20 торр. Сравните полученную вами величину P_{50} с физиологическим значением, равным 26 торр.

ГЛАВА 5.
Молекулярные болезни: серповидноклеточная анемия

В 1904 г. чикагский врач Джеймс Херрик (J. Herrick) обследовал больного – студента-негра в возрасте 21 года, – поступившего в больницу по поводу кашля и лихорадочного состояния. Больной жаловался на слабость, головокружение, головную боль. До поступления на протяжении года он страдал от приступов сердцебиения и недостатка воздуха; последние несколько лет больной все меньше участвовал в спортивных играх и других мероприятиях, связанных с физической нагрузкой; за 3 года до поступления у него в течение 6 месяцев отмечалось выделение гноя из уха. С детства он часто страдал от нарывов на ногах, которые заживали очень медленно.

При обследовании больного существенных отклонений от нормы в физическом и умственном развитии не отмечалось. Белки глаз были с желтоватым оттенком, слизистые оболочки бледны, лимфатические узлы увеличены. На голенях и бедрах было обнаружено около 20 рубцов. Значительные отклонения от нормы наблюдались со стороны сердца: расширение границ, шум. Как писал Херрик, «... создавалось впечатление, что сердце работает под действием какого-то мощного стимулятора, хотя никаких стимулирующих сердечных средств больной не получал».

Лабораторное обследование включало тщательный анализ кала больного с целью выявления возможных паразитов, вероятность заражения которыми у больного, выросшего в тропиках, достаточно велика. Однако никаких паразитов найдено не было. В мокроте не было обнаружено туберкулезных палочек. В моче содержались остатки клеток, что указывало на поражение почек. При анализе крови было установлено резкое отклонение от нормы:

	Обнаружено	Границы нормы
Количество эритроцитов	$2{,}6 \cdot 10^6$ мл	$(4{,}6–6{,}2) \cdot 10^6$ мл
Содержание гемоглобина	8 г/100 мл	(14–18 г)/100 мл
Количество лейкоцитов	15 250 мл	4000–10 000 мл

Больной, несомненно, страдал анемией, поскольку содержание гемоглобина было вдвое ниже нормы. Его эритроциты очень различались по размеру, причем многие из них были гораздо мельче, чем в норме. Кроме того, выявлялось большое число эритроцитов, содержащих ядро. Такие ядерные клетки служат предшественниками нормальных зрелых эритроцитов, лишенных ядра. Херрик так описал необычные эритроциты больного: «Красные кровяные тельца отличались непостоянством формы, но *что особенно привлекало внимание, это большое число тонких, удлиненных серповидных, похожих на полумесяц клеток*. Они обнаруживались в свежих пробах крови вне зависимости от того, как наносили кровь на стекло. В пробах крови, взятой одновременно у других лиц и обработанной в точно таких же условиях, такие клетки не обнаруживались. Несомненно, что они не были ни артефактом, ни какой-либо формой паразитического организма».

Больному было назначено общеукрепляющее лечение: отдых, хорошее питание. Через четыре недели он выписался. Самочувствие его улучшилось, количество гемоглобина возросло. Однако в крови все еще выявлялись «своеобразные, в форме полумесяца красные кровяные тельца, хотя их было меньше, чем раньше».

Рис. 5.1. Серповидные клетки в крови больного серповидноклеточной анемией. Вид под световым микроскопом. (Печатается с любезного разрешения д-ра F. Bunn.)

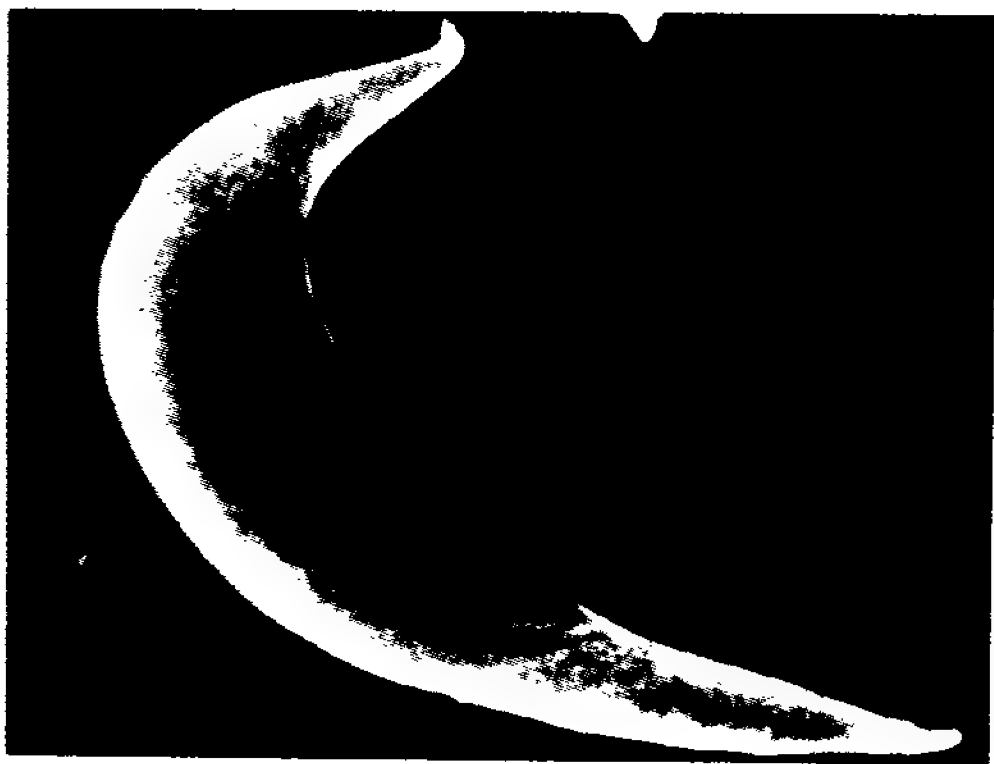


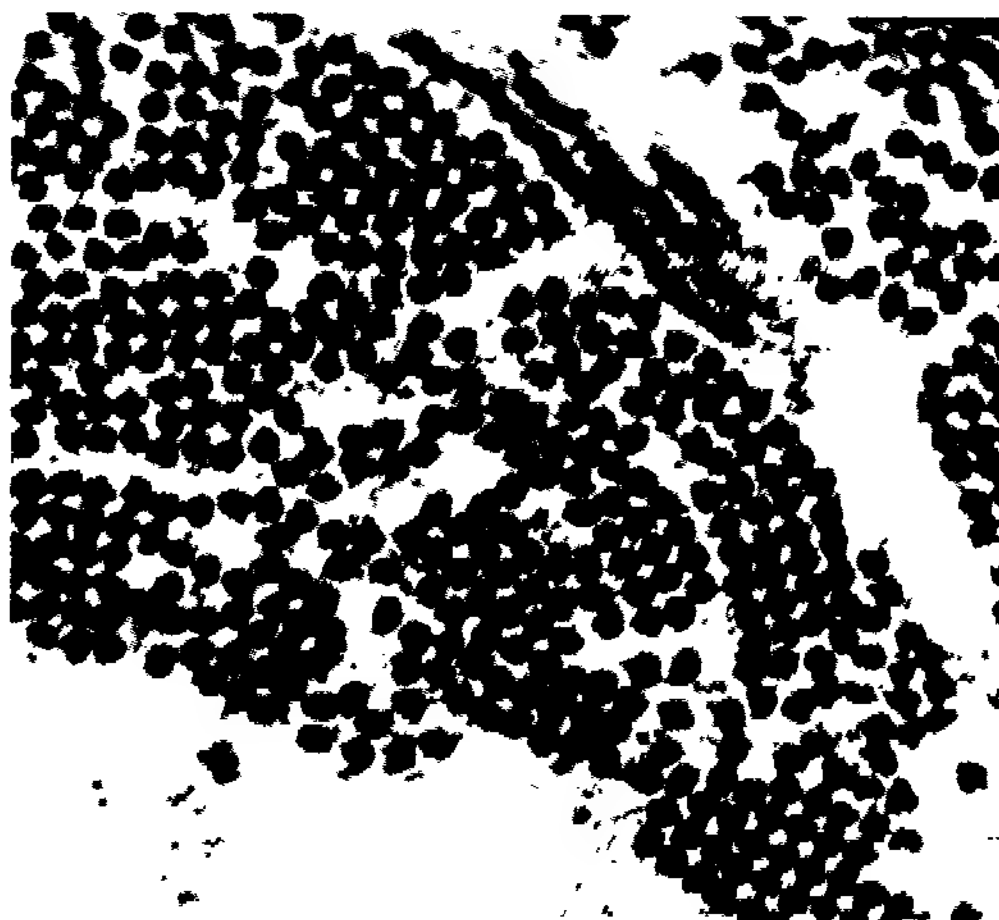
Рис. 5.2. Эритроцит больного серповидноклеточной анемией; микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Печатается с любезного разрешения д-ра J. Thornwaite и д-ра R. Leif.)

Херрик был поражен такой клинической картиной и лабораторными данными. Прошло 6 лет, прежде чем он решился опубликовать этот случай, чистосердечно признавая, что больному «нельзя даже было поставить какой-либо диагноз». Автор отметил хронический характер заболевания и разнообразие патологических изменений, выявляемых при осмотре и по лабораторным данным: увеличение сердца, опухание всех лимфатических узлов, желтуха, анемия, признаки повреждения почек. Он пришел к выводу, что происхождение заболевания нельзя связать с органическим поражением какого-либо одного органа. Херрик выделил как ведущий симптом нарушение картины крови и озаглавил сообщение об этом случае *Своеобразные удлиненные и серповидные красные кровяные тельца в случае тяжелой анемии.* Херрик высказал предположение, что «первопричиной заболевания может быть какое-либо неизвестное изменение состава самих телец».

5.1. Серповидноклеточная анемия – хроническая гемолитическая болезнь, передающаяся по наследству

Вскоре после публикации Херрика были обнаружены и другие случаи этого заболевания, названного «серповидноклеточной анемией». В самом деле, серповидноклеточная анемия – отнюдь не редкая болезнь. В странах с достаточно большой прослойкой негритянского населения это заболевание представляет значительную проблему для здравоохранения. У негров серповидноклеточная анемия встречается с частотой 4 случая на 1000 человек. В прошлом серповидноклеточная анемия приводила обычно к гибели больного, нередко в возрасте до 30 лет, вследствие инфекции, почечной недостаточности, сердечной недостаточности или тромбоза.

Серповидные эритроциты застревают в мельчайших кровеносных сосудах. В результате нарушается кровоснабжение, что приводит к повреждению различных органов, в особенности почек и костей. Серповидные клетки отличаются большей хрупкостью, чем нормальные. Поскольку они легко гемолизируются, их срок жизни укорочен. В результате развивается тяжелая анемия. Хроническое течение заболевания проходит через кризы, когда доля серпо-



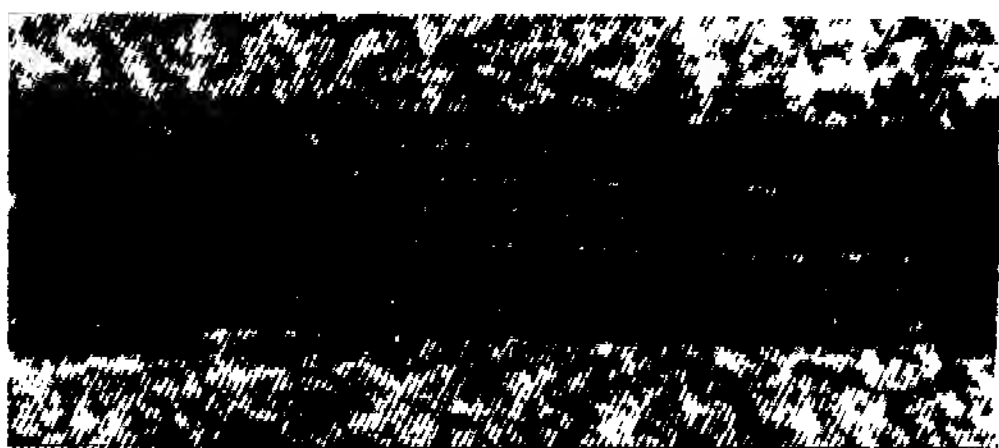


Рис. 5.3. Электронная микрофотография волокон дезоксигенированного гемоглобина серповидных клеток. На верхнем рисунке – поперечный срез, на нижнем – продольный срез. Толщина волокон – 170 Å. [Finch J.T., Perutz M.F., Bertles J.F., Döbler J., Proc. Nat. Acad. Sci., **70**, 719 (1973).]

видных клеток в крови возрастает особенно сильно. Во время кризов у больного может развиться шок.

Серповидноклеточная анемия передается по наследству. Больные *серповидноклеточной анемией гомозиготны по дефектному гену*, локализованному в одной из аутосом. Люди, получившие один дефектный ген от одного из родителей и один нормальный аллель от другого, являются *носителями признака серповидноклеточности*. У таких *гетерозигот* симптомы болезни обычно не проявляются, так как на долю серповидных эритроцитов у них приходится всего лишь 1% общего числа эритроцитов в венозной крови; у гомозиготных индивидов количество серповидных эритроцитов достигает 50%. Однако и носительство признака серповидноклеточности, которое встречается у негров в одном случае из десяти, не совсем благоприятно для организма. Так, для носителей признака серповидноклеточности может представлять опасность большая физическая нагрузка в высокогорье, полеты в негерметизированных самолетах, наркоз. Почему? Мы выясним это в ходе дальнейшего изложения.

5.2. Дезоксигенированный серповидноклеточный гемоглобин имеет пониженную растворимость

Херрик высказал правильное предположение о локализации первичного дефекта, обусловливающего серповидноклеточную анемию. При снижении концентрации кислорода эритроциты больного приобретают серповидную форму на предметном стекле in vitro. Оказалось, что в этих клетках дефектен сам гемоглобин. Растворимость дезоксигемоглобина серповидных клеток примерно в 25 раз ниже растворимости нормального гемоглобина. При дезоксигенировании концентрированного раствора гемоглобина серповидных клеток образуется волокнистый осадок (рис. 5.3). Именно такой осадок деформирует эритроцит, придавая ему серповидную форму. Гемоглобин серповидных клеток принято обозначать как гемоглобин S (Hb S) в отличие от гемоглобина A (Hb A) – нормального гемоглобина взрослого человека.

5.3. Гемоглобин S отличается от гемоглобина A по электрофоретической подвижности

В 1949 г. Полинг (Pauling) и его сотрудники изучали физико-химические свойства гемоглобина в норме, при носительстве признака серповидноклеточности и при заболевании серповидноклеточной анемией. Использованный ими экспериментальный подход состоял в следующем: они сопоставляли подвижность исследуемых гемоглобинов в электрическом поле. Метод определения подвижности в электрическом поле называется *электрофорезом*. Скорость миграции (V) белка (или какого-либо другого соединения) в электрическом поле зависит от напряженности электрического поля (E), общего

заряда белка (Z) и сопротивления трения (f). Сопротивление трения определяется размером и формой белка. Указанные величины связаны между собой соотношением

$$V = \frac{EZ}{f}. \qquad (1)$$

Изоэлектрическая точка белка – это значение pH, при котором данный белок не несет электрического заряда. При таком значении pH электрофоретическая подвижность равна нулю, поскольку $Z = 0$ [уравнение (1)]. При pH ниже изоэлектрической точки молекула белка заряжена положительно; при значениях pH, лежащих выше изоэлектрической точки, белок заряжен отрицательно. Гемоглобин серповидных клеток отличается от нормального по изоэлектрической точке:

	Гемоглобин нормальных эритроцитов	Гемоглобин серповидных клеток	Разница
Оксигемоглобин	6,87	7,09	0,22
Дезоксигемоглобин	6,68	6,91	0,23

Как видно из приведенной таблицы, различие между серповидноклеточным и нормальным гемоглобином для окисленной и восстановленной форм одинаково.

Различие в электрофоретической подвижности гемоглобина A и S может объясняться изменением либо общего заряда Z, либо коэффициента трения f. Сам по себе эффект трения (обусловленный изменением формы) выразился бы в том, что одно вещество двигалось бы медленнее другого во всем диапазоне pH. В рассматриваемом случае этого не происходило, судя по тому, что кривые зависимости электрофоретической подвижности от pH имели одинаковый угол наклона (рис. 5.4). Кроме того, другие физико-химические исследования, а именно определение скорости седиментации и свободной диффузии показали, что коэффициенты трения оксигенированных форм гемоглобина A и гемоглобина S были одинаковы.

На основании этих наблюдений был сделан вывод *о различии в числе или типе ионизированных групп в сравниваемых гемоглобинах*. Сколько таких групп в каждом из гемоглобинов? Ответ дает кривая кислотно-основного титрования гемоглобинов. В области pH 7 эта кривая почти линейна. Изменение pH раствора гемоглобина на единицу создает разницу почти на 13 зарядов. Стало быть, различие в изоэлектрических точках на 0,23 соответствует примерно трем зарядам в молекуле гемоглобина. Отсюда следует, что *гемоглобин серповидных клеток отличается от нормального наличием дополнительных 2–4 положительных зарядов*.

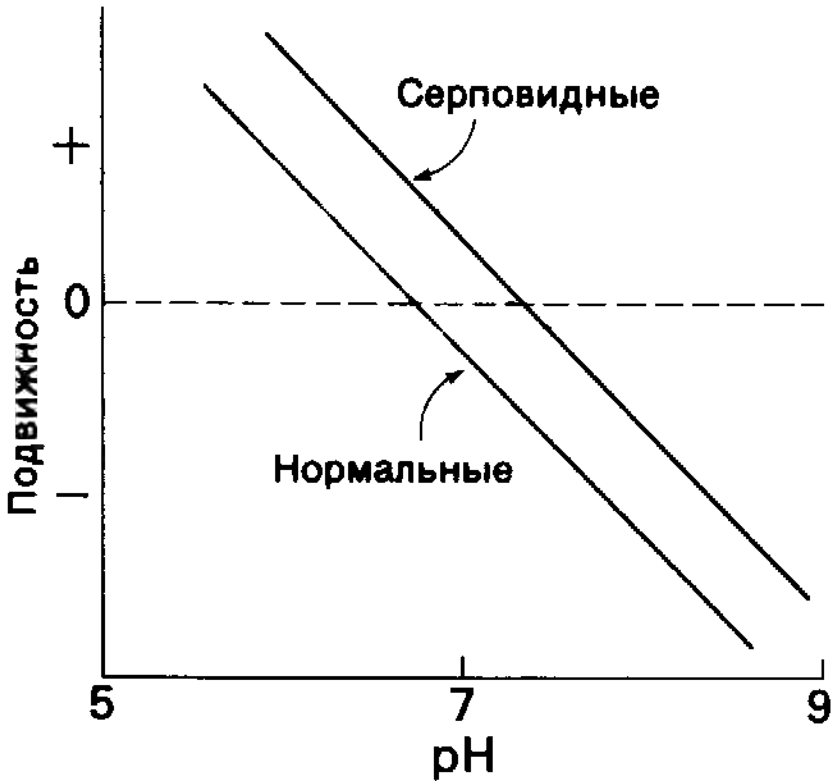


Рис. 5.4. Зависимость от pH электрофоретической подвижности нормального гемоглобина и гемоглобина серповидных клеток.

С чем связано это отличие: с изменением состава полипептидной цепи или с изменением гема? Из серповидноклеточного гемоглобина был выделен порфирин; по данным определения точки плавления и рентгеноструктурного анализа он оказался идентичен порфирину нормального гемоглобина. Это показывает, что *различие между двумя гемоглобинами заключается в особенностях состава полипептидных цепей*.

У больных серповидноклеточной анемией (всегда гомозиготных по дефектному гену) имеется гемоглобин S и нет гемоглобина A. В то же время у носителей признака серповидноклеточности (которые гетерозиготны по гену серповидноклеточности) оба гемоглобина содержатся примерно в равных количествах (рис. 5.5). Таким образом, в работе Полинга был выявлен бесспорный случай изменения молекулы белка при изменении аллелей кодирующего его гена. Это был первый пример *молекулярной болезни*.

5.4. Получение пептидных карт: выявление аминокислотной замены в гемоглобине серповидных клеток

Итак, электрофоретический анализ показал, что гемоглобин S имеет 2–4 дополнительных положительных заряда по сравнению с гемоглобином A. Возможны разные пути возникновения такого различия в заряде молекулы:

Hb A		HbS
Нейтральная аминокислота	→	Положительно заряженная аминокислота
Отрицательно заряженная аминокислота	→	Положительно заряженная аминокислота
Отрицательно заряженная аминокислота	→	Нейтральная аминокислота



Рис. 5.5. Электрофорез на крахмальном геле при pH 8,6 гемоглобина здорового человека, гемоглобина носителя признака серповидноклеточности и гемоглобина больного серповидноклеточной анемией.

Выяснение вопроса, какая конкретно замена произошла в гемоглобине S, относится к 1954 г., когда Вернон Ингрем (V. Ingrem) разработал новый метод определения аминокислотных замен в белках. Для проведения анализа молекулу гемоглобина расщепляли на фрагменты, поскольку в небольших пептидах, содержащих примерно по 20 аминокислот, выявить замену аминокислоты, безусловно, легче, чем в целой молекуле белка, значительно большей (в 10 раз) по размеру. Гемоглобин подвергали специфическому расщеплению трипсином по пептидным связям, образованным карбоксильными группами лизина и аргинина. Поскольку в αβ-половине гемоглобина содержится в общей сложности 27 остатков лизина и аргина, при *триптическом гидролизе* образовалось 28 разных пептидов. Следующий этап состоял в разделении полученных пептидов. Для этого был применен метод *двумерного разделения* (рис. 5.6). Смесь пептидов наносили в виде небольшого пятна в угол большого листа фильтровальной бумаги. Далее проводили *электрофорез* в одном направлении, разделяя таким образом пептиды в соответствии с их общим зарядом. Однако полного разделения

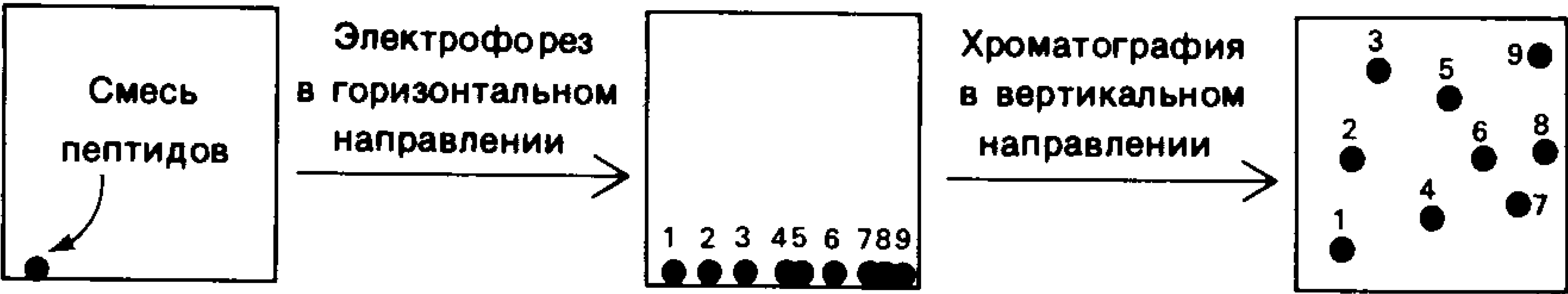


Рис. 5.6. Смесь пептидов разделяют путем электрофореза в горизонтальном направлении с последующей хроматографией в вертикальном направлении.

смеси при этом не происходило. Многие пептиды накладывались друг на друга. Поэтому продолжали процесс разделения, но уже методом *хроматографии на бумаге*, причем это разделение проводили в направлении, перпендикулярном направлению электрофореза.

Хроматография –

термин введен Михаилом Цветом в 1906 г. применительно к разделению смеси пигментов из листьев растения на колонке карбоната кальция. М. Цвет сравнил этот процесс с «разложением света на спектр».

Образовано от греческих слов chroma – цвет и graphein – рисовать, писать.

Процедура состояла в следующем: конец бумаги, ближайший к разделяемым пептидам, помещали в смесь органических растворителей и воды, налитую на дно герметично закрывающейся стеклянной банки. При этом растворитель поднимался вверх по бумаге. В такой ситуации каждый пептид мог либо мигрировать с растворителем (неполярная среда), либо оставаться на обводненной целлюлозе бумаги (высокополярная среда). Такой метод разделения называется *распределительной хроматографией*. Пептид с наиболее выраженными неполярными свойствами будет растворяться в растворителе и, следовательно, подниматься вместе с фронтом растворителя вверх по бумаге; в то же время самый полярный из пептидов останется на бумаге внизу. Рассматриваемые методы – хроматография на бумаге и электрофорез – дополняют друг друга, поскольку они разделяют пептиды на основе независимых свойств; первый – на основе различий в полярности, второй – на основе различий в общем заряде. Вся последовательность проведения анализа – избирательное расщепление белка на небольшие пептиды с их последующим разделением в двух направлениях – называется методом *пептидных карт (отпечатков пальцев)*.

Получаемые в результате пептидные карты дают очень наглядный результат. После окрашивания нингидрином пятна пептидов становятся ясно видны. Сравнение карт гемоглобина А и гемоглобина S показало, что *все их пептидные пятна идентичны, за исключением одного*. Это пятно элюировали с каждой из пептидной карт и определили, что в обоих случаях оно соответствует пептиду из 8 аминокислот. При последующем аминокислотном анализе обнаружилось, что пептид гемоглобина S отличается от пептида гемоглобина А лишь по одной аминокислоте.

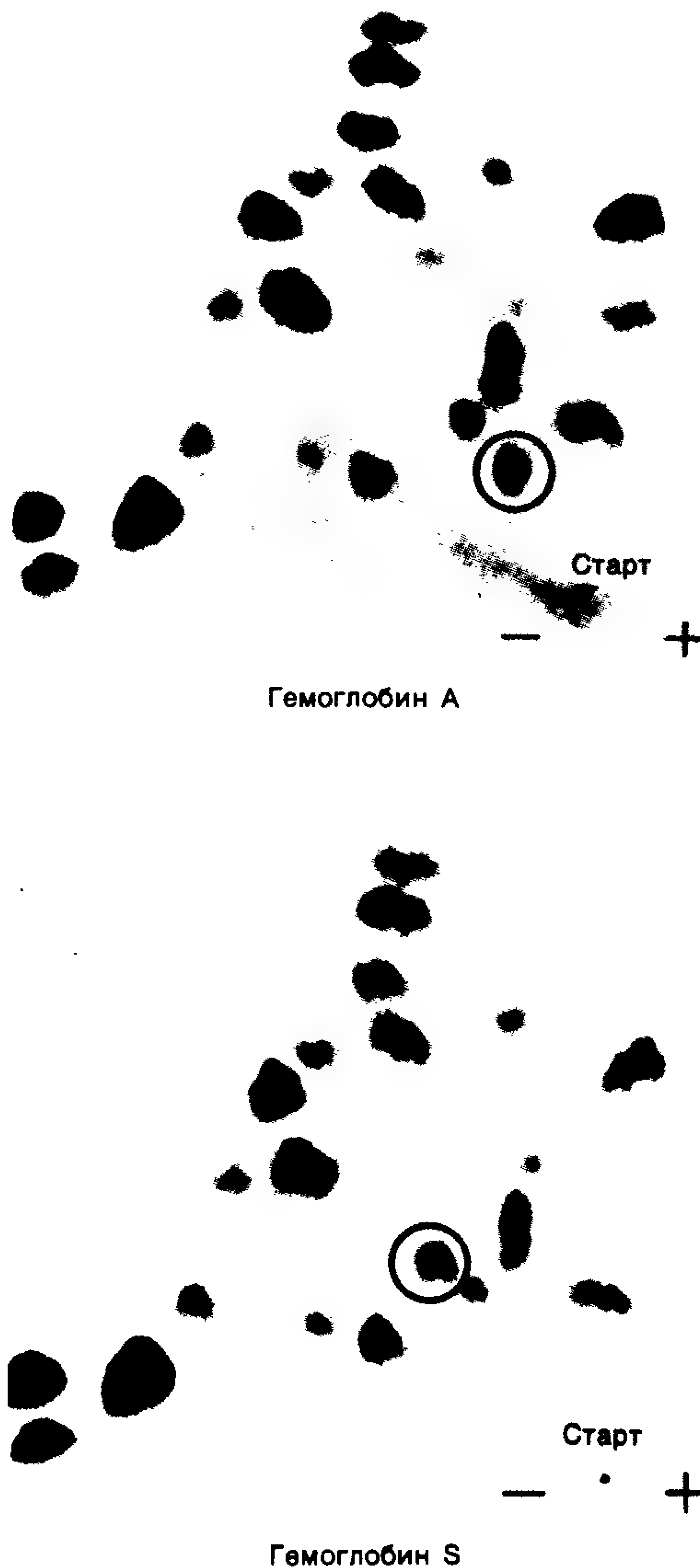


Рис. 5.7. Сравнение окрашенных нингидрином пептидных карт гемоглобина А и гемоглобина S. Красным кружком обведен пептид, по которому различаются эти гемоглобины. (Печатается с любезного разрешения д-ра С. Baglioni.)

5.5. В β-цепи произошла замена одной-единственной аминокислоты

α- и β-Цепи разделили методом ионообменной хроматографии. Далее получили их пептидные карты. Оказалось, что гемоглобин S отличается от гемоглобина А по β-цепи, в частности по N-концевому триптическому

пептиду β-цепи. Определив аминокислотную последовательность этого пептида, Ингрем показал, что *в β-цепи гемоглобина S в 6-м положении вместо глутамата стоит валин:*

Гемоглобин А	Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys-
Гемоглобин S	Val-His-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Lys-
	β1 2 3 4 5 6 7 8

5.6. На поверхности гемоглобина серповидных клеток имеются «липкие» участки

Валин имеет неполярную боковую цепь, тогда как глутамат – высокополярную. Замена глутамата валином в 6-м положении β-цепи приводит к тому, что на поверхности гемоглобина S оказывается неполярный остаток (рис. 5.8). В результате *растворимость дезоксигенированного гемоглобина S значительно снижается, тогда как растворимость оксигенированного гемоглобина S практически не изменяется.* Этот факт лежит в основе всей клинической картины серповидноклеточной анемии, а также особенностей, характерных для признака серповидноклеточности.

Молекулярный механизм появления серповидных эритроцитов можно представить себе следующим образом.

1. Замена глутаминовой кислоты на валин приводит к появлению «липкого» участка (sticky patch) на наружной стороне каждой β-цепи гемоглобина S (рис. 5.9). Такой «липкий» участок имеется как в окси-, так и в дезоксигемоглобине S, но не в гемоглобине А.

2. В дезоксигемоглобине S имеется участок, комплементарный «липкому» участку (рис. 5.9). Локализация комплементарного участка пока не установлена. Комплементарный участок одной молекулы дезоксигемоглобина S взаимодействует с «липким» участком другой молекулы дезоксигемоглобина S, что приводит к образованию агрегатов большой длины, деформирующих эритроцит.

3. В оксигемоглобине S комплементарный участок замаскирован. «Липкий» участок в нем имеется. Однако недоступность комплементарного участка препятствует соединению молекул гемоглобина S друг с другом.

4. Таким образом, *эритроциты серповидной формы появляются в условиях, когда дезоксигенированная форма гемоглобина S достигает высокой концентрации* (рис. 5.10).

Исходя из этих фактов, можно объяснить ряд клинических симптомов серповидноклеточной анемии. Так, при появлении серповидных эритроцитов в мельчайших сосудах возникает порочный круг. Серповидные клетки блокируют кровеносный сосуд, что создает локальную недостаточность кислорода. В результате в этом участке больше гемоглобина переходит в дезоксиформу и еще больше образуется деформированных, серповидных эритроцитов. У носителей признака серповидноклеточности симптомов болезни обычно не наблюдается, потому что содержание гемоглобина S в этом случае не превышает половины общего количества гемоглобина. При нормальной концентрации кислорода такое содержание гемоглобина S не настолько велико, чтобы вызвать деформацию эритроцита. Однако при значительном снижении парциального давления кислорода (на большой высоте, например) серповидные эритроциты могут появиться и у носителей признака серповидноклеточности.

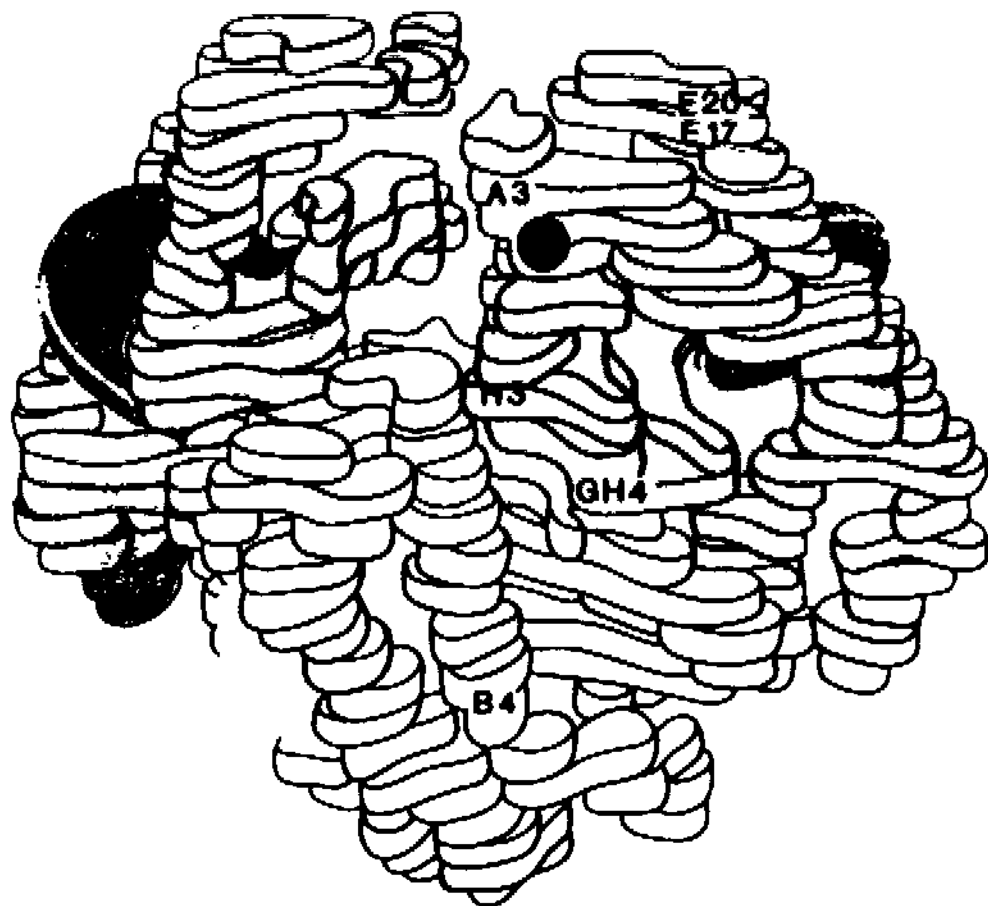


Рис. 5.8. Модель дезоксигемоглобина А при низком разрешении, α-Цепи показаны желтым, β-цепи – голубым. Участок, в котором произошла замена аминокислоты в гемоглобине S, отмечен красным. Обратите внимание, что этот участок находится на поверхности молекулы. [Finch J.T., Perutz M.F., Bertles J.F., Döbler J., Proc. Nat. Acad. Sci, **70**, 721 (1973).]

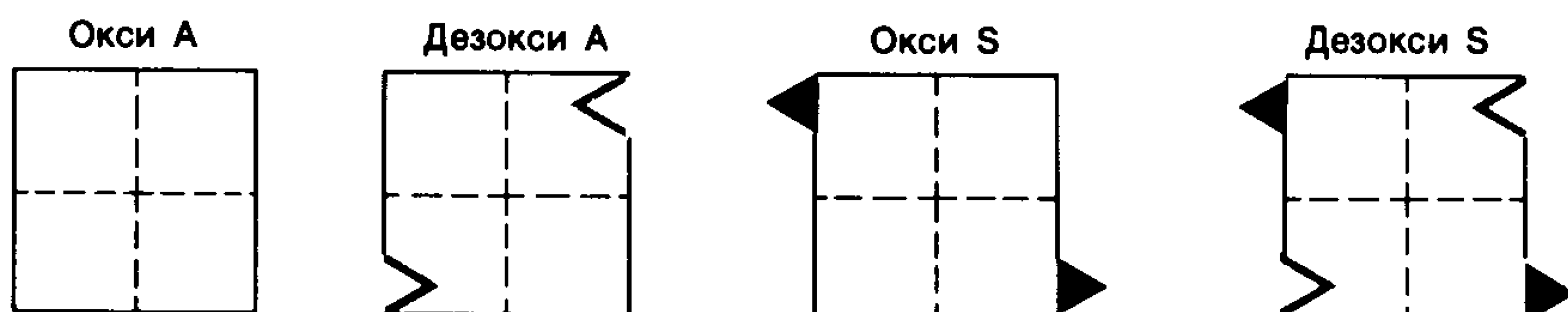


Рис. 5.9. Красными треугольниками показаны «липкие» участки, имеющиеся как в окси-, так и дезоксигемоглобине S, но отсутствующие в гемоглобине А. Комплементарный участок изображен в виде зазубрины, соответствующей треугольнику. Этот комплементарный участок имеется в дезоксигемоглобине S и не исключено, что и в дезоксигемоглобине А.

5.7. Дезоксигемоглобин S образует длинные спирализованные волокна

Как указывалось выше, дезоксигемоглобин S образует волокнистый осадок, который деформирует эритроциты, придавая им серповидную форму (рис. 5.2). При электронно-микроскопическом исследовании выявляются волокна двух типов: диаметром 170 Å (рис. 5.3) и чаще диаметром 215 Å (рис. 5.11). По-видимому, в основном образуются волокна, представляющие собой спираль из 14 нитей, в которой 10 молекул гемоглобина S расположены снаружи и 4 молекулы – внутри (рис. 5.12). Существенная особенность этой построенной из нитей спирали состоит в том, что каждая молекула гемоглобина S контактирует по крайней мере с восемью другими. Ясно, что спираль стабилизирована многочисленными связями. Связь с участием валина-6 в β-цепи сдвигает термодинамическое равновесие дезоксиформы гемоглобина в сторону образования волокон, однако это не единственный фактор стабилизации спирали.

5.8. Скорость образования волокон в высокой степени зависит от концентрации дезоксигемоглобина S

Кинетика образования волокон дезоксигемоглобина S имеет большое значение, поскольку именно от нее зависит, успеет ли эритроцит приобрести серповидную форму за то время, когда он проходит через капилляры, т.е. примерно за 1 с. Наиболее важным фактором при этом является концентрация дезоксигемоглобина S; это было показано в опытах in vitro, в которых был использован тот факт, что растворимость дезоксигемоглобина S при низких температурах значительно выше, чем при высоких. Полимеризацию дезоксигемоглобина S вызывали, быстро повышая температуру раствора от 4 до 37°С. Об образовании волокон судили по изменению физических свойств раствора, а именно светорассеяния. При достаточно низкой концентрации гемоглобина S образование волокон происходит с задержкой на много минут (рис. 5.13). Время задержки τ зависит от концентрации c (точнее от термодинамической активности) дезоксигемоглобина S в соответствии с уравнением

$$1/\tau = k(c/C_s)^n,$$

где C_s – растворимость гемоглобина S при равновесии, k – константа, зависящая от условий среды, n – показатель степени. Полученное экспериментальным путем значение n оказалось поразительно большим числом – около 10. Другими словами, *скорость образования волокон пропорциональна 10-й*

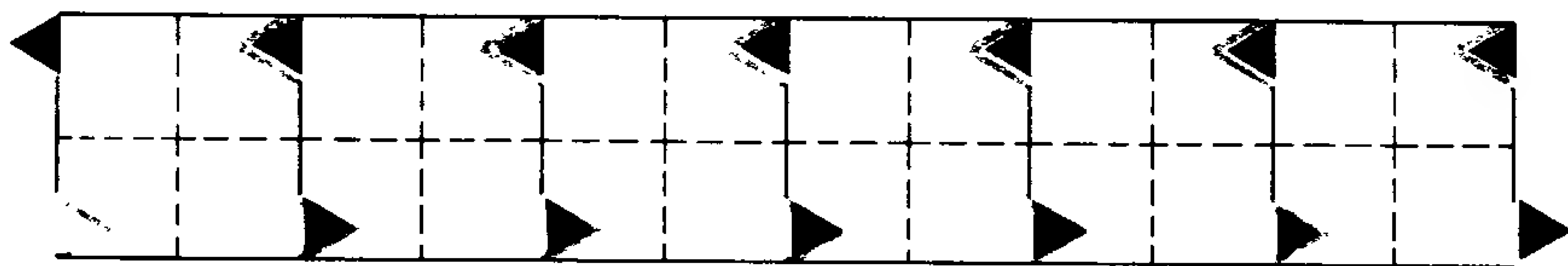


Рис. 5.10. Взаимодействие «липкого» участка в дезоксигемоглобине S с комплементарным участком другой молекулы дезоксигемоглобина S приводит к образованию длинных агрегатов. Здесь показана одна из сформированных таким образом нитей спирализованного волокна.

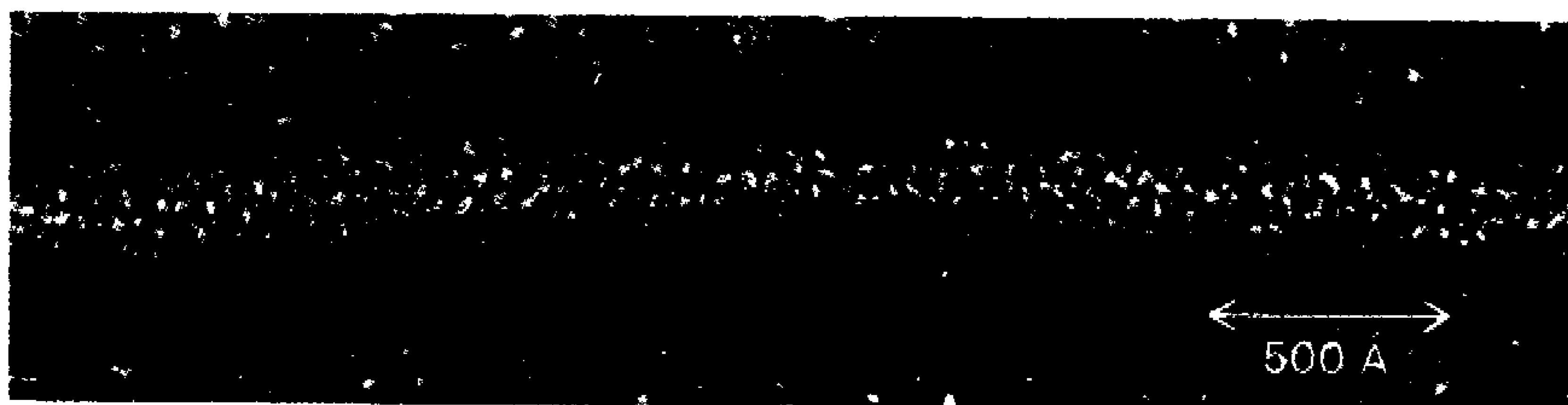


Рис. 5.11. Электронная микрофотография негативно окрашенного волокна дезоксигемоглобина S. [Dykes G., Crepeau R.H., Edelstein S.J., Nature, **272**, 509 (1978).]

степени активности гемоглобина S. Следовательно, формирование волокон представляет собой высокосогласованный процесс. Изучение кинетики этого процесса показало, что фазой, лимитирующей скорость образования волокон, является образование центра агрегации (нуклеация). После возникновения конгломерата критического размера (примерно из 10 молекул дезоксигемоглобина S) дальнейший рост волокна происходит очень быстро (рис. 5.14). Указанный размер агрегата соответствует, по-видимому, большей части одного витка спирали из 14 нитей (рис. 5.12). Эти данные имеют большое клиническое значение. Они показывают, что *кинетические*, а также термодинамические факторы играют важную роль в формировании серповидных эритроцитов. Даже при высоком содержании дезоксигемоглобина S эритроциты не приобретут серповидной формы, если время их прохождения от капилляров тканей к альвеолам легких, где происходит оксигенация, короче, чем лаг-период процесса волокнообразования. Высокая степень зависимости скорости полимеризации от концентрации дезоксигемоглобина S объясняет также, почему носительство признака серповидноклеточности протекает обычно бессимптомно. Дело в том, что концентрация дезоксигемоглобина S в эритроцитах гетерозигот примерно в 2 раза ниже, чем в эритроцитах соответствующих гомозигот, а следовательно, скорость образования волокон должна быть примерно в 1000 раз медленнее ($2^{10} = 1024$).

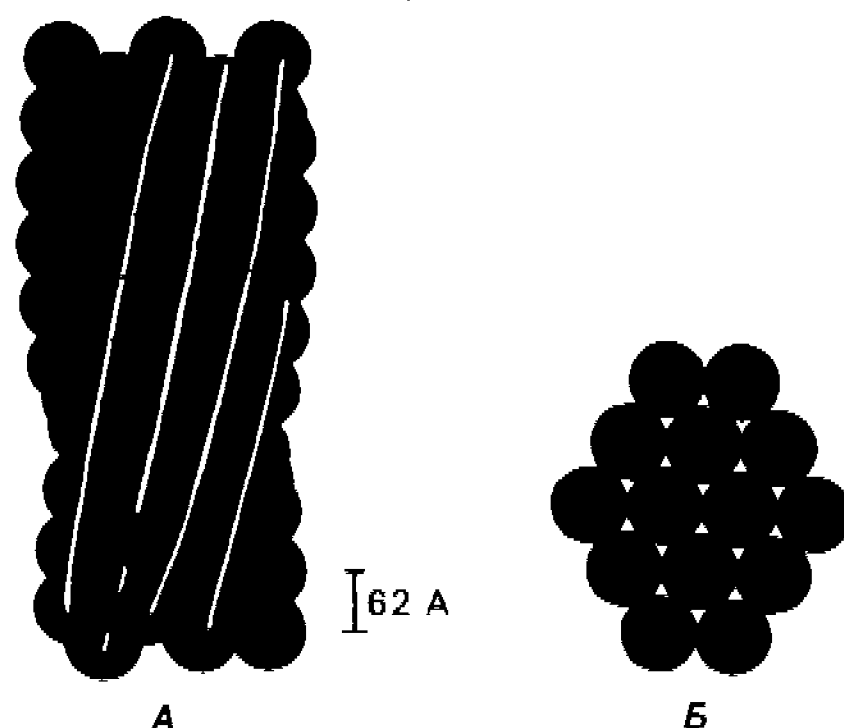


Рис. 5.12. Модель волокна дезоксигемоглобина S, построенного из 14 спирализованных нитей. *А* – продольный разрез, *Б* – поперечный разрез. Каждый кружок соответствует тетрамеру гемоглобина S. [Dykes G., Crepeau R.H., Edelstein S.J., Nature, **272**, 509 (1978).]

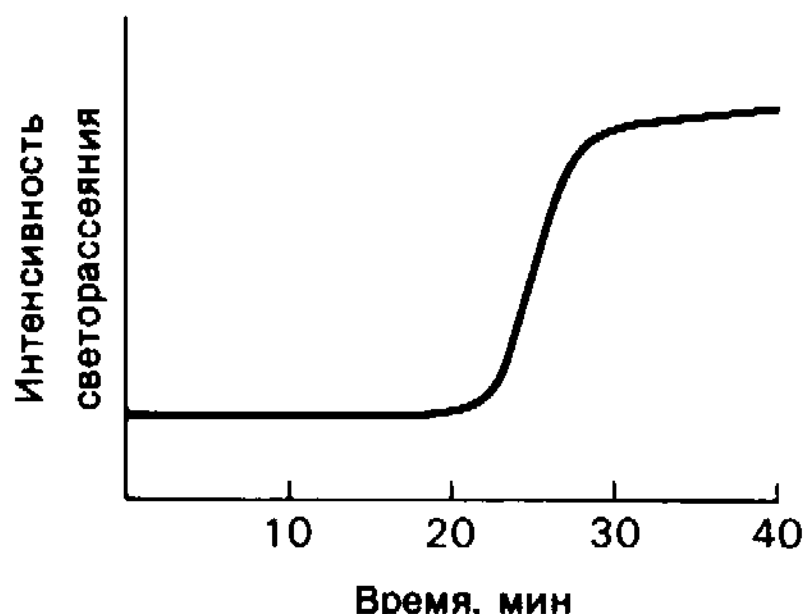


Рис. 5.13. Кинетика образования волокон дезоксигемоглобина S in vitro по данным измерения светорассеяния. Полимеризацию вызывали быстрым повышением температуры от 4 до 37°С. Длительный лаг-период соответствует фазе агрегации (комплексообразованию).

5.9. Высокая частота гена серповидноклеточности обусловлена его защитным эффектом в отношении малярии

Частота гена серповидноклеточности в некоторых областях Африки достигает 40%. До последнего времени индивиды, гомозиготные по этому гену, погибали, не достигнув зрелости; из этого следует, что высокая частота этого гена в популяции могла сохраниться только под сильным давлением естественного отбора. Джеймс Нил (J. Neel) высказал предположение, что гетерозиготное состояние должно давать какие-то преимущества по сравнению с гомозиготным по нормальному либо по дефектному гену. И действительно, Антони Аллисон (A. Allison) обнаружил, что носительство признака серповидноклеточности служит защитой от заболевания наиболее тяжелой формой малярии, приводящей обычно

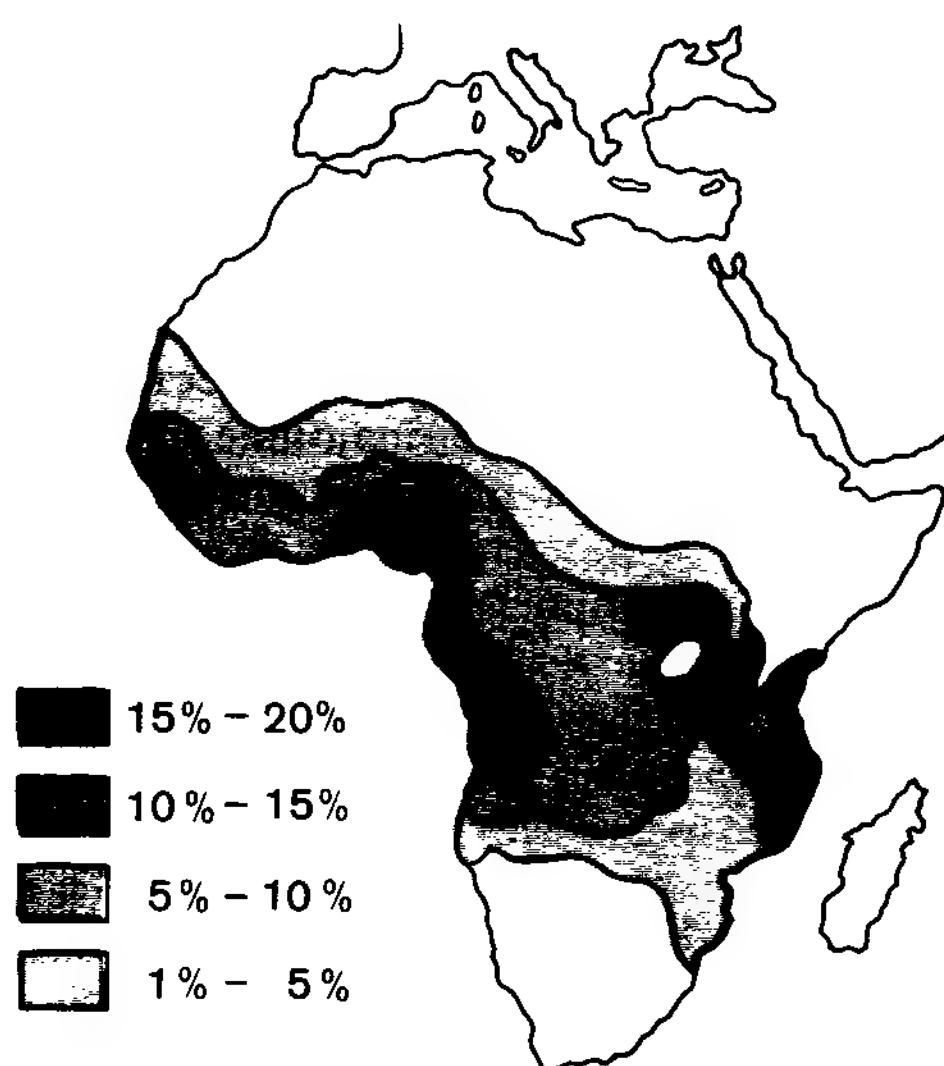


Рис. 5.15. Распространение гена серповидноклеточности в Африке. Высокая частота этого гена ограничена районами, где малярия является основной причиной смертности. (Allison A.C., Sickle cells and evolution. Copyright 1956, Scientific American, Inc.)

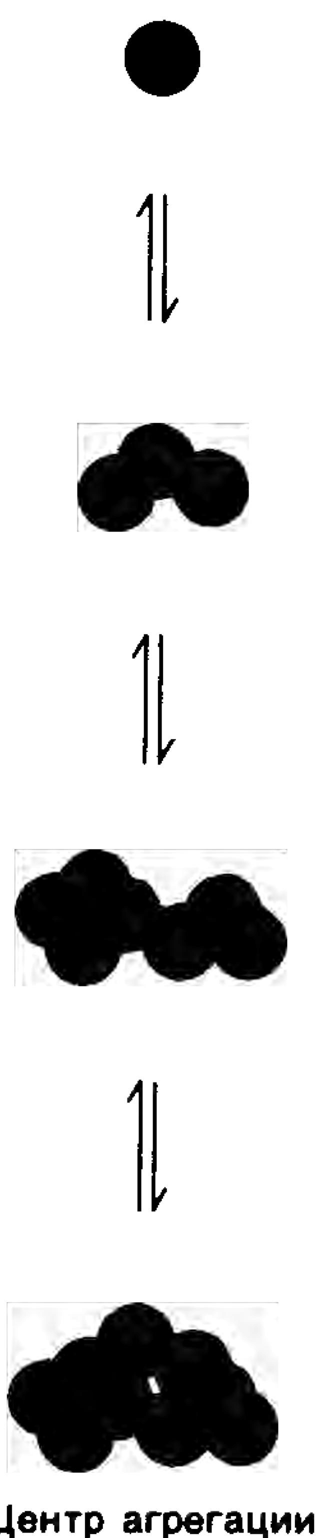


Рис. 5.14. Фаза агрегации при формировании волокон дезоксигемоглобина A. Сборка центров агрегации происходит медленнее, чем дальнейший рост агрегатов. [Hofrichter J., Ross P.D., Eaton W.A., Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 4864 (1974).]

к смертельному исходу. Выявлена отчетливая корреляция между распространением малярии и частотой гена серповидноклеточности в Африке (рис. 5.15). Описанный феномен представляет собой типичный случай *сбалансированного полиморфизма*: гетерозиготы устойчивы в отношении малярии и не страдают от серповидноклеточной анемии, тогда как люди, гомозиготные по нормальному аллелю, восприимчивы к малярии.

5.10. Стратегия поиска лекарственных средств для лечения серповидноклеточной анемии

Сведения о молекулярном механизме возникновения серповидноклеточной анемии позволяют в настоящее время перейти к поиску специфических нетоксичных препаратов, предупреждающих или задерживающих развитие клинической картины заболевания. Поиски ведутся в трех направлениях. Одна группа перспективных средств – это вещества, тормозящие образование волокон из гемоглобина S. В качестве таких

7-665

стереоспецифических ингибиторов гелеообразования проходят оценку синтетические олигопептиды, последовательность аминокислот в которых соответствует N-концевому участку β^S-цепи и другим участкам контактов в молекуле гемоглобина S. Ко второй группе исследуемых веществ относятся соединения, повышающие сродство гемоглобина S к кислороду и тем самым снижающие концентрацию его дезокси-формы. Так, например, *цианат проникает в эритроциты и повышает сродство гемоглобина к кислороду путем необратимого карбамоилирования α-аминогрупп.* Гемоглобин быстро реагирует с цианатом, потому что HN=C=O (изоциановая кислота) в неионизированной форме является реакционно способным аналогом O=C=O. Вспомним, что концевые аминогруппы гемоглобина участвуют в обратимом связывании CO_2 (разд. 4.15). На использование цианата в лечении серповидноклеточной анемии возлагались большие надежды, пока обширные клинические испытания не выявили его побочных токсических эффектов. Так, у некоторых больных при лечении цианатом развивалось поражение периферических нервов, обусловленное, вероятно, тем, что карбамоилированию подвергаются не только гемоглобин, но и другие белки. Сейчас ведется поиск менее токсичных модификаторов гемоглобина. Третий возможный подход к лечению серповидноклеточной анемии – *снижение общей концентрации гемоглобина S в эритроцитах.* Этого можно достичь, например, увеличением объема клетки. Поскольку скорость образования волокон из дезоксигемоглобина в очень большой степени зависит от его концентрации, даже незначительное увеличение объема эритроцита оказало бы выраженный лечебный эффект. Отсюда следует, что ионные насосы и каналы эритроцитарной мембраны – это те потенциальные мишени, на которые должно быть направлено действие терапевтических средств, используемых для лечения серповидноклеточной анемии.

5.11. Молекулярная патология гемоглобина

При обследовании больных с симптомами серповидноклеточной анемии, а также при проведении электрофоретического анализа гемоглобинов здоровых людей было обнаружено более 100 аномальных гемоглобинов. В северной Европе гетерозиготность по варианту гемоглобина А встречается у 1 человека из 300. Частота любого из мутантных аллелей обычно составляет менее 10^{-4}; это на несколько порядков ниже, чем частота гена серповидноклеточности в районах, эндемичных по малярии. Другими словами, большинство аномальных гемоглобинов не дает организму никаких преимуществ в естественном отборе. Как правило, наличие аномальных гемоглобинов либо никак не влияет на здоровье человека, либо оказывается пагубным.

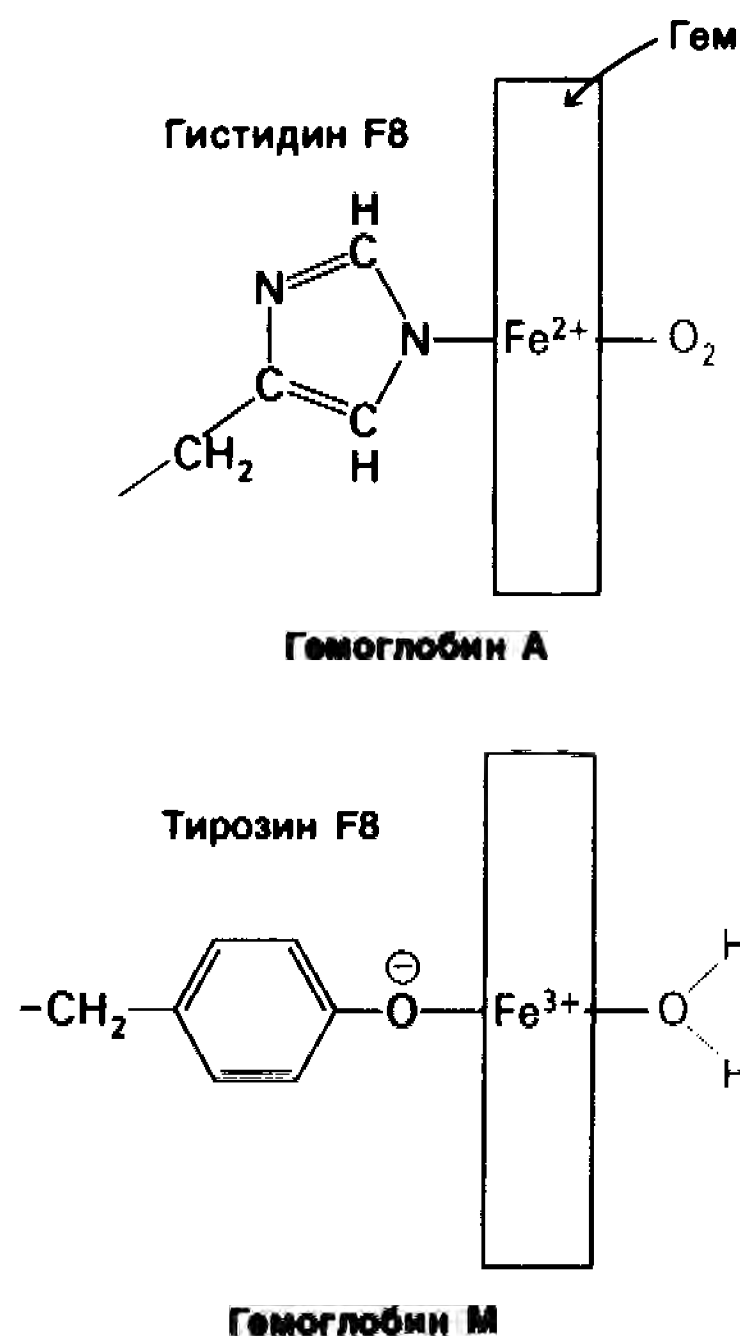


Рис. 5.16. Замена проксимального гистидина (F8) тирозином приводит к образованию гемоглобина M. Отрицательно заряженный атом кислорода тирозина связывается с атомом железа, находящимся в ферри-форме. В шестое координационное положение встает вода, а не O_2.

Различают несколько типов аномальных гемоглобинов.

1. *Изменена наружная часть молекулы.* Почти все замены аминокислот на поверхности молекулы гемоглобина безвредны. Гемоглобин S представляет собой поразительное исключение.

2. *Изменен активный центр.* В этом случае в дефектной субъединице не происходит

связывания кислорода, так как структурные изменения вблизи гема непосредственно влияют на связывание кислорода.

3. *Изменена третичная структура.* Замена аминокислот препятствует возникновению нормальной конформации молекулы. Такие гемоглобины обычно нестабильны.

4. *Изменена четвертичная структура.* Некоторые мутации, затрагивающие участки области контактов, приводят к потере аллостерических свойств. В результате нарушается сродство таких гемоглобинов к O_2.

5.12. Гемоглобин М: продукт мутации в активном центре

Замена проксимального или дистального гистидина в группе гема на тирозин приводит к стабилизации окисленной (ферри) формы гема, не способной к связыванию кислорода (рис. 5.16). В этом случае ионизированная боковая цепь тирозина образует комплекс с окисленным железом гема. Указанная замена может произойти как в α-, так и в β-цепи. Действительно, были обнаружены все четыре мутантных варианта. Мутантные гемоглобины, у которых два гема в молекуле постоянно находятся в ферриформе, называют *гемоглобином М*. Буква М указывает, что мутировавшие цепи находятся в форме *метгемоглобина* (ферригемоглобина). У людей с гемоглобином М обычно отмечается цианоз. Заболевание встречается только у гетерозиготных особей, поскольку гомозиготность по этому признаку почти всегда приводит к летальному исходу.

5.13. Полярные группы в щели, занимаемой гемом, ослабляют его связывание с полипептидной цепью

Еще один тип мутации, затрагивающей активный центр, выражается в том, что в щели, занимаемой гемом, на место неполярной группы становится полярная. Между гемом и полипептидной цепью существует 60 межатомных контактов, причем эти контакты по своей природе неполярны. Поскольку эти неполярные взаимодействия устойчиво сохраняются в нормальных гемоглобинах разных видов животных, можно думать, что большинство из них имеет существенное значение для функционирования молекулы гемоглобина. В самом деле, мутации в участках связывания гема почти всегда приводят к неблагоприятным последствиям. Рассмотрим для примера гемоглобин Hammersmith. На месте фенилаланина CD1 (рис. 5.17) в этом гемоглобине находится серин. В результате такой замены нарушается связывание гема. Объяснить это можно следующим путем: вероятно, наличие полярного остатка серина способствует тому, что в щель, обычно занимаемую гемом, проникает вода.

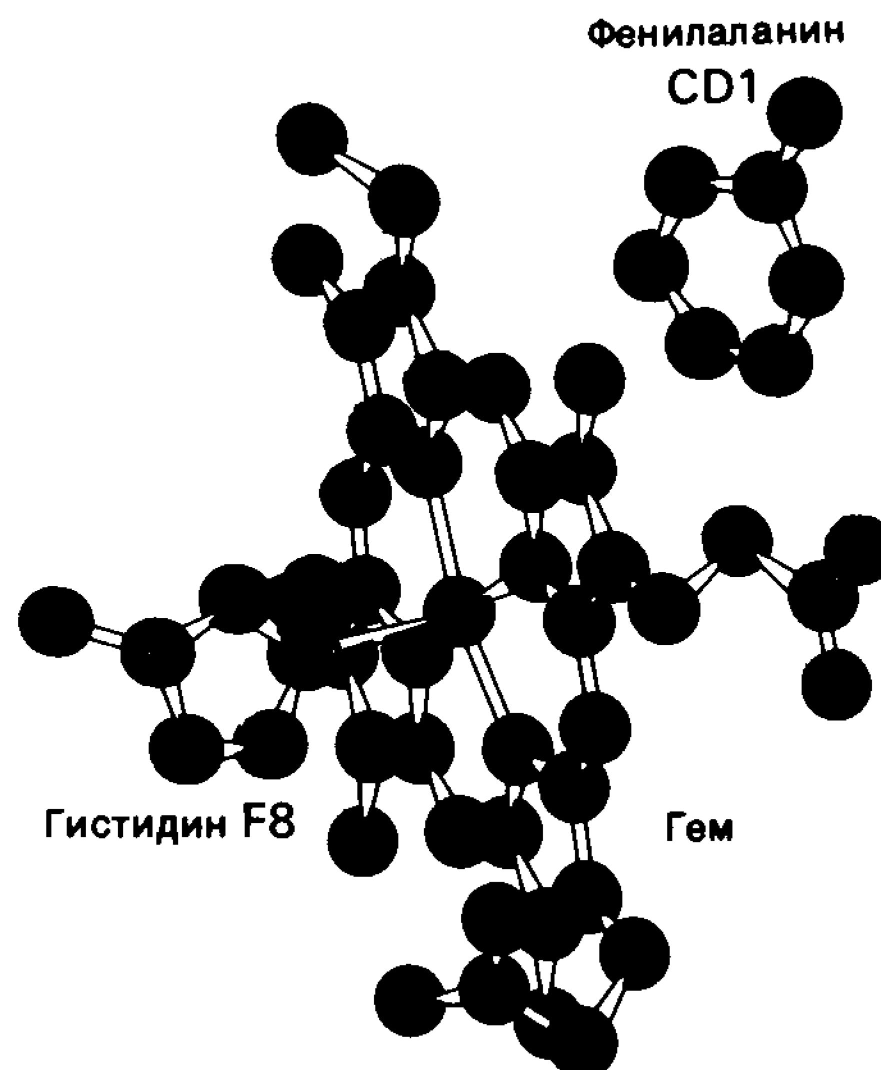


Рис. 5.17. Локализация фенилаланина CD1, одного из инвариантных остатков в гемоглобине. Ароматическое кольцо этого фенилаланина находится в контакте с гемом.

5.14. В результате некоторых мутаций гемоглобины утрачивают стабильность из-за деформаций третичной структуры

Замены аминокислот в отдаленных от гема участках могут препятствовать возникновению нормальной конформации гемоглобина и тем самым резко нарушать его функцию. Большой интерес в этом отношении представляет гемоглобин Riverdale-Bronx, у которого в положении B6 вместо глицина стоит аргинин. Из-за больших размеров аргинин не умещается в том узком пространстве, в котором должны пересекаться спирали B и E (рис. 5.18). Действительно, во всех нормальных гемоглобинах и миоглобинах положение B6 всегда занято глицином. Гемоглобин Riverdale-Bronx в результате про-

изошедшей аминокислотной замены оказывается нестабильным.

Гемоглобин Gun Hill принадлежит к числу редко встречающихся аномальных гемоглобинов, у которых не один, а несколько аминокислотных остатков затронуты мутацией. В указанном гемоглобине произошла потеря пяти аминокислот в каждой β-цепи, а именно выпал последний аминокислотный остаток в F-спирали и следующие четыре остатка в углу, образованном F- и G-спиралями. В нормальном гемоглобине соответствующий фрагмент полипептидной цепи образует контакты с гемом. Выпадение указанного фрагмента в результате мутации приводит к тому, что β-цепи гемоглобина Gun Hill не содержат гема. Клиническое проявление этой мутации – гемолитическая анемия.

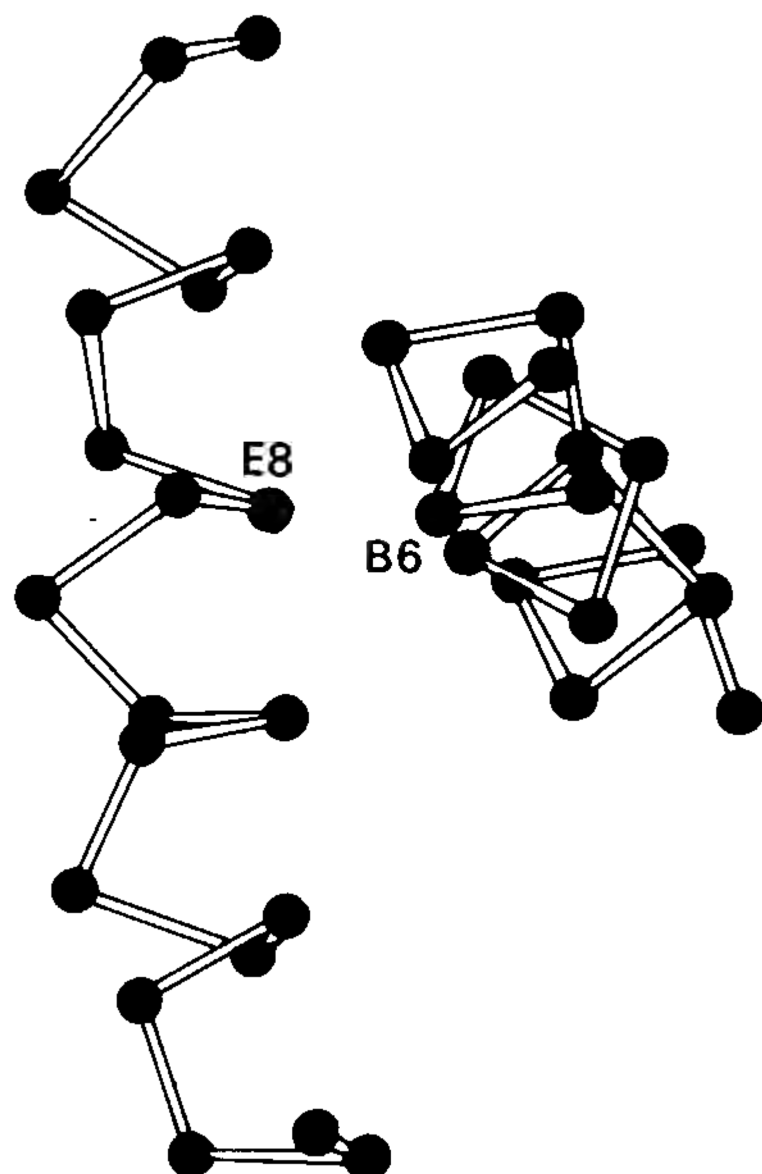


Рис. 5.18. Молекула гемоглобина принимает нормальную структуру, только если в положении B6 стоит остаток глицина. Поскольку именно в этом участке перекрещиваются спирали B и E, для большей, чем у глицина, боковой цепи нет места.

5.15. Мутации в области контактов нарушают аллостерические взаимодействия

Для функционирования гемоглобина в качестве эффективного переносчика кислорода необходимо сохранение всех его аллостерических свойств. Целостность участка, связывающего гем, и правильная укладка субъединиц гемоглобина – условие необходимое, но отнюдь не достаточное для полноценного функционирования. Важная роль принадлежит аминокислотным остаткам, локализованным в области контактов между субъединицами, так как некоторые из этих остатков передают информацию от одной субъединицы к другой. Контакты между одноименными субъединицами гемоглобина немногочисленны и по своей природе полярны, тогда как контакты между разноименными субъединицами обширны и в основном неполярны. Существуют два типа контактов между α- и β-цепями, обозначаемые соответственно $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_1\beta_2$. Как уже отмечалось, $\alpha_1\beta_2$-*контакт* играет, по-видимому, ключевую роль в передаче аллостерических взаимодействий,– судя по тому, что именно в этой области наблюдается значительное перемещение атомов при оксигенировании гемоглобина. Об этом свидетельствует и тот факт, что *почти все гемоглобины с заменами в области $\alpha_1\beta_2$-контактов проявляют пониженную кооперативность. Более того, обычно и сродство этих гемоглобинов к кислороду отличается от нормы.*

Например, гемоглобин Kempsey характеризуется $P_{50} = 15$ торр, тогда как для нормального гемоглобина P_{50} равно 26 торр. При этой мутации аспартат в положении G1 в β-цепи заменен аспарагином. Почему такая замена проявляется в значительном повышении сродства к кислороду? Вспомним, что в дезоксигемоглобине область $\alpha_1\beta_2$-контакта в норме стабилизирована водородной связью между остатками аспартата G1 и тирозина в α-цепи (разд. 4.9). Эта водородная связь обеспечивает устойчивость T-состояния (tense, напряженное), характерного для нормального дезоксигемоглобина. *Отсутствие указанной водородной связи в гемоглобине Kempsey уменьшает стабильность T-состояния, сродство к кислороду в результате повышается. В обратной ситуации в тех же случаях, когда в результате мутации нарушается стабильность R (релаксированного) состояния, следует ожидать снижения сродства к кислороду.* Действительно, P_{50} гемоглобина Kansas равен 70 торр. У больных с таким гемоглобином резко выражен цианоз, поскольку уровень насыщения кислородом их

артериальной крови составляет 0,6 против 0,97 в норме. В гемоглобине Kansas произошла замена аспарагина G4 на треонин, вследствие чего не образуется той водородной связи, которая в норме стабилизирует оксигемоглобин.

5.16. Значение открытия мутантных гемоглобинов

Выявление мутаций белков-переносчиков кислорода оказало большое влияние на молекулярную биологию, медицину, генетику и антропологию. Мутантные гемоглобины используются в трех линиях исследований.

1. *Мутантные гемоглобины позволяют понять взаимосвязь между структурой и функцией нормального гемоглобина.* Мутация по одному аминокислотному остатку представляет собой высокоспецифическую химическую модификацию молекулы, осуществленную самой природой. Такие мутации помогают выявить, какая часть молекулы имеет наиболее важное значение для функции.

2. *На примере мутантных гемоглобинов было впервые обнаружено, что болезнь может возникнуть в результате замены одной-единственной аминокислоты в одной полипептидной цепи определенного белка.* Вся концепция о молекулярных болезнях, составляющая теперь неотъемлемую часть медицины, возникла при изучении гемоглобина серповидных клеток.

3. *Выявление мутантных гемоглобинов расширяет наши представления об эволюционных процессах.* Мутации служат «сырьем» для эволюции. Как показало изучение серповидноклеточной анемии, мутация может быть одновременно и полезной, и вредной. Процесс эволюции может приводить к болезни у отдельных особей; это красочно описали Цукеркандл и Полинг (Zuckerkandl, Pauling 1962):

> «С субъективной точки зрения эволюция чаще всего сводилась к страданиям от болезни. Эти болезни были, безусловно, молекулярными. Выражение концепции добра и зла, которую человек изобразил как свое печальное изгнание из рая, это, может быть, молекулярная болезнь, обернувшаяся эволюцией».

Заключение

Изменение одной-единственной аминокислоты в одном-единственном белке, вызванное мутацией гена, может быть причиной определенной болезни. Наиболее изученная молекулярная болезнь – серповидноклеточная анемия. Аномальный гемоглобин больных серповидноклеточной анемией, обозначаемый как гемоглобин S, состоит из двух нормальных α-цепей и двух мутантных β-цепей. Мутация выражается в том, что в β-цепи гемоглобина S в 6-м положении вместо глутамата стоит валин. Такое замещение полярной боковой цепи на неполярную приводит к резкому понижению растворимости дезоксигемоглобина S. Растворимость же оксигемоглобина S остается нормальной. Дезоксигенированный гемоглобин S образует волокнистый осадок, который деформирует эритроцит, придавая ему форму серпа. Серповидные эритроциты быстро разрушаются, что создает в итоге клиническую картину хронической гемолитической анемии. Серповидноклеточная анемия возникает только у лиц, гомозиготных по мутантному гену, детерминирующему синтез β-цепи гемоглобина S. У гетерозиготных особей синтезируется и гемоглобин S, и гемоглобин A. Гетерозиготное состояние, называемое признаком серповидноклеточности, протекает обычно бессимптомно. Среди негритянского населения примерно один человек из десяти гетерозиготен по гену серповидноклеточности. Такая высокая частота этого мутантного гена, вредоносного для организма в случае гомозиготности, обусловлена тем, что носительство мутантного гена оказывается полезным признаком – явление, известное как сбалансированный полиморфизм. Лица, гетерозиготные по гену серповидноклеточной анемии, оказываются устойчивыми к самой тяжелой, летальной форме малярии.

При изучении гемоглобина у гематологических больных, а также при обследовании здоровых людей было обнаружено более 100 мутантных форм гемоглобина. Гемоглобины, отличающиеся по электрофоретической подвижности от гемоглобина A, подвергают анализу методом пептидных карт («отпечатков пальцев») и затем определяют последовательность аминокислот того пептида, по которому исследуемый гемоглобин отличается от гемоглобина A. Выявлено несколько классов мутаций гемоглобинов. К мутациям первого класса относятся замены аминокислот на поверхности молекулы; почти всегда эти замены безвредны, а гемоглобин S составляет поразительное

исключение. Мутации второго класса – это замены аминокислот вблизи гема, что обычно приводит к нарушению связывания кислорода. Например, в гемоглобине М проксимальный либо дистальный гистидин заменен на тирозин; в результате гемоглобин М стабилизирован в ферри(мет)форме и не способен связывать кислород. При мутациях третьего класса замены происходят во внутренней части молекулы, которые нередко приводят к изменению третичной структуры и как следствие к нестабильности молекулы гемоглобина. Примером может служить гемоглобин, в котором аргинин стоит вместо глицина в том участке, где глицин необходим в силу своей малой величины. Изменения в участках контактов между субъединицами обычно сопровождаются потерей аллостерических свойств. Замены аминокислот, стабилизирующие гемоглобин в состоянии либо T, либо R, приводят к изменению сродства к кислороду.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Allison A.C., 1956. Sickle cells and evolution, Sci. Amer., **195** (2), 87–94.

Perutz M.F., Lehmann H., 1968. Molecular pathology of human haemoglobin, Nature, **219**, 902–909. (О выдающихся работах, посвященных более чем 50 мутантным гемоглобинам. Показана корреляция между клиническими симптомами и характером изменений структуры гемоглобина.)

Серповидноклеточная анемия

Dean J., Schechter A.N., 1978. Sickle-cell anemia: molecular and cellular bases of therapeutic approaches. New Engl. J. Med., **299**, 752–763; 804–811 and 863–870. (Великолепный обзор, посвященный структурным, генетическим и клиническим аспектам серповидноклеточной анемии.)

Herrick J.B., 1910. Peculiar elongated and sickleshaped red blood corpuscles in a case of severe anemia, Arch. Intern. Med., **6**, 517–521.

Neel J.V., 1949. The inheritance of sickle-cell anemia, Science, **110**, 64–66.

Pauling L., Itano H.A., Singer S.J., Wells I.C., 1949. Sickle cell anemia: a molecular disease, Science, **110**, 543–548.

Ingram V.M., 1957. Gene mutation in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle-cell haemoglobin, Nature, **180**, 326–328.

Pasvol G., Weatherall D.J., Wilson R.J.M., 1978. Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against P. falciparum malaria, Nature, **274**, 701–703.

Behe M.J., Englander S.W., 1978. Sickle hemoglobin gelation: reaction order and critical nucleus size, Biophys. J., **23**, 129–145.

Eaton W.A., Hofrichter J., Ross P.D., 1976. Delay time of gelation: a possible determinant of clinical severity in sickle cell disease, Blood, **47**, 621–627.

Другие мутантные гемоглобины

Bunn H.F., Forget B.G., Ranney H.M., 1977. Human Hemoglobins, Saunders.

Caughey W.S. (ed.), 1978. Biochemical and Clinical Aspects of Hemaglobin Abnormalities, Academic Press.

Lehmann H., Huntsman R.G., 1974. Man's Haemoglobins (2nd ed.), Lippincott.

Winslow R.M., Anderson W.F., 1978. The hemoglobinopathies. In: Stanbury J.B., Wyngaarden J.B. and Fredrickson D.S. (eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease (4th ed.), pp. 1465–1507. McGraw-Hill.

Bellingham A.J., 1976. Hemoglobins with altered oxygen affinity, Brit. Med. Bull., **32**, 234–238.

Болезни и эволюция

Zuckerkandl E., Pauling L., 1962. Molecular disease, evolution, and genic heterogeneity. In: Kasha M. and Pullman B. (eds.), Horizons in Biochemistry, pp. 189–225, Academic Press.

[Имеется перевод: Горизонты биохимии./ Под ред. М. Каша, Б. Пюльмана.– М.: Мир, 1964, с. 148–173.]

Cavalli-Sforza L.L., Bodmer W.F., 1971. The Genetics of Human Populations, Freeman. (Вопрос о генетическом полиморфизме прекрасно представлен в гл. 4 и 5.)

Вопросы и задачи

1. При проведении программы обследования обнаружен гемоглобин с аномальной электрофоретической подвижностью. Судя по пептидной карте трипсинового гидролизата гемоглобина, замена аминокислоты произошла в β-цепи. Отсутствует нормальный N-концевой триптический пептид (Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys). Обнаружен новый триптический пептид, состоящий из 6 аминокислотных остатков. N-концевым остатком в этом пептиде оказался валин.

а) Замене каких аминокислот соответствуют эти данные?

б) Как этот гемоглобин должен отличаться от HbA и HbS по электрофоретической подвижности при pH 8?

2. Ниже показана электрофоретическая подвижность ряда мутантных гемоглобинов A при pH 8,6.



Как распределяются места a, b, c и d между гемоглобинами следующего состава:

Hb D (α 68)	Лизин вместо аргинина
Hb J (β 69)	Аспартат вместо глицина
Hb N (β 95)	Глутамат вместо лизина
Hb C (β 6)	Лизин вместо глутамата

3. Некоторые мутации гена гемоглобина оказывают влияние на все три гемоглобина A_1, A_2 и F, тогда как другие – только на один из них. Почему?

4. Если гемоглобин человека с признаком серповидноклеточности (т. е. гетерозиготного по гену серповидноклеточности) подвергнуть электрофорезу на крахмальном геле, то выявляются две основные полосы. Одна из них – HbA° ($\alpha_2\beta_2$), вторая – HbS ($\alpha_2\beta_2$). Отсутствие третьей полосы с промежуточной электрофоретической подвижностью дало основание думать, что гибридной молекулы $\alpha_2\beta\beta^S$ не существует. Однако в дальнейшем такой гибридный гемоглобин был обнаружен в растворе. Почему он не выявляется при электрофорезе на крахмальном геле? (Подсказка: подумайте о влиянии электрического поля на равновесие $2(\alpha_2\beta\beta^S) \rightleftarrows \alpha_2\beta_2 + \alpha_2\beta_2^S$.)

5. HbA тормозит образование длинных волокон из HbS и последующую деформацию эритроцитов (в серповидные клетки) при дезоксигенировании. Как объяснить этот эффект HbA?

6. При высокой ионной силе гемоглобин расщепляется в участке $\alpha_1\beta_2$-контакта на $\alpha\beta$-димеры. Какова способность к диссоциации окси- и дезоксиформы гемоглобина Kempsey по сравнению с гемоглобином A?

ГЛАВА 6.
Введение в энзимологию

Химические реакции в биологических системах редко протекают в отсутствие катализатора. Роль таких катализаторов выполняют специфические белки, называемые *ферментами*. Всем ферментам свойственны удивительно высокая каталитическая сила и специфичность. При этом активность многих ферментов регулируется. Кроме того, ряд ферментов непосредственно участвует в трансформации различных форм энергии. Рассмотрим эти отличительные свойства ферментов, имеющие крайне важное значение для биологических процессов.

6.1. Ферменты обладают огромной каталитической силой

Ферменты ускоряют реакции по крайней мере в миллион раз. В самом деле, в отсутствие ферментов скорость большинства реакций в биологических системах практически неощутима. Даже такая простая реакция, как гидратирование диоксида углерода,


катализируется ферментом:


$CO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3$.

В отсутствие фермента перенос CO_2 из тканей в кровь и затем в воздух легочных альвеол был бы неполон. Карбоангидраза, катализирующая эту реакцию, принадлежит к числу самых активных ферментов из всех известных. Каждая молекула карбоангидразы способна гидратировать 10^5 молекул CO_2 в 1 с. Скорость реакции гидратирования CO_2 в присутствии фермента в 10^7 раз выше, чем в его отсутствие.

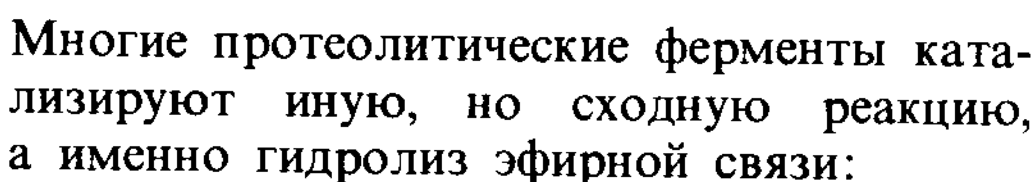
6.2. Ферменты обладают высокой специфичностью

Ферменты обладают высокой специфичностью как в отношении катализируемой ими реакции, так и в отношении *субстратов*, т. е. участвующих в реакции веществ. Каждый фермент катализирует какую-либо одну химическую реакцию или же несколько очень сходных реакций. Степень специфичности к субстрату обычно высока, а иногда практически абсолютна.

Рассмотрим в качестве примера *протеолитические ферменты*. Они катализируют реакцию гидролиза пептидной связи:

$$\text{—NH—CH(R}_1\text{)—CO—NH—CH(R}_2\text{)—CO—} + H_2O \rightleftarrows \text{—NH—CH(R}_1\text{)—COO}^- + H_2N\text{—CH(R}_2\text{)—CO—}$$

Пептид — **Карбоксильный компонент** — **Аминный компонент**


Многие протеолитические ферменты катализируют иную, но сходную реакцию, а именно гидролиз эфирной связи:

$$R_1\text{—CO—O—}R_2 + H_2O \rightleftarrows R_1\text{—COO}^- + HO\text{—}R_2 + H^+$$

Эфир — **Кислота** — **Спирт**

Протеолитические ферменты сильно различаются по степени субстратной специфичности. Так, субтилизин, синтезируемый определенным видом бактерий, расщепляет пептидную связь независимо от природы прилежащей к ней боковой цепи. С другой стороны, трипсин, как уже упоминалось в гл. 2, проявляет высокую специфичность в том отношении, что расщепляет пептидные связи, образованные карбоксильными группами только лизина и аргинина (рис. 6.1). Тромбин, участвующий в свертывании крови, проявляет еще более высокую специфичность, чем трипсин. Он разрывает только те пептидные связи, которые образованы карбоксильной группой аргинина и аминогруппой глицина (рис. 6.2).

Другим примером высокой степени специфичности ферментов может служить ДНК-полимераза I. Этот фермент синтезирует ДНК, соединяя друг с другом четыре типа нуклеотидов – строительных блоков ДНК. Последовательность нуклеотидов в синтезируемой цепи ДНК определяется последовательностью нуклеотидов в другой цепи ДНК, играющей роль матрицы (рис. 6.3). ДНК-полимераза I отличается поразительно высокой точностью в выполнении тех инструкций, которые задаются матрицей. В синтезируемых цепях ДНК ошибочно включенный нуклеотид встречается реже чем один раз на миллион.

6.3. Активность некоторых ферментов регулируется

Некоторые ферменты синтезируются в *форме неактивного предшественника* и переходят в активное состояние в физиологически соответствующем месте и времени. Примером регуляции такого типа могут служить пищеварительные ферменты. Так, трипсиноген синтезируется в поджелудочной железе, а активируется в тонком кишечнике, где в результате расщепления пептидной связи образуется активная форма – трипсин (рис. 6.4). Такой же тип регуляции многократно используется в последовательности ферментативных реакций, ведущих к свертыванию крови. Каталитически неактивные предшественники протеолитических ферментов называются *проферментами*, или *зимогенами*.

Еще один механизм регуляции ферментативной активности заключается в том, что с ферментом ковалентно связывается небольшая дополнительная группа. Это так называемый механизм *ковалентной моди-*

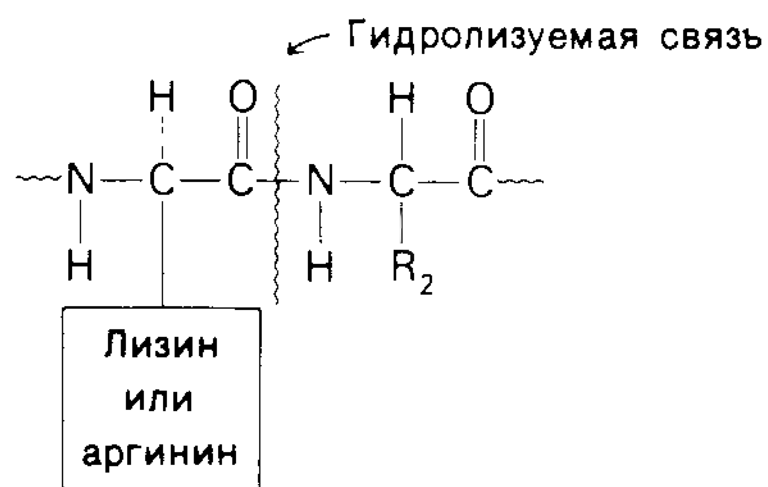


Рис. 6.1. Специфичность трипсина.

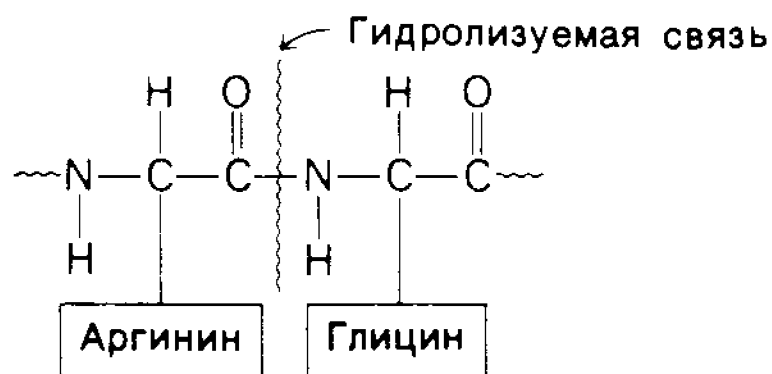


Рис. 6.2. Специфичность тромбина (фактора свертывания крови).

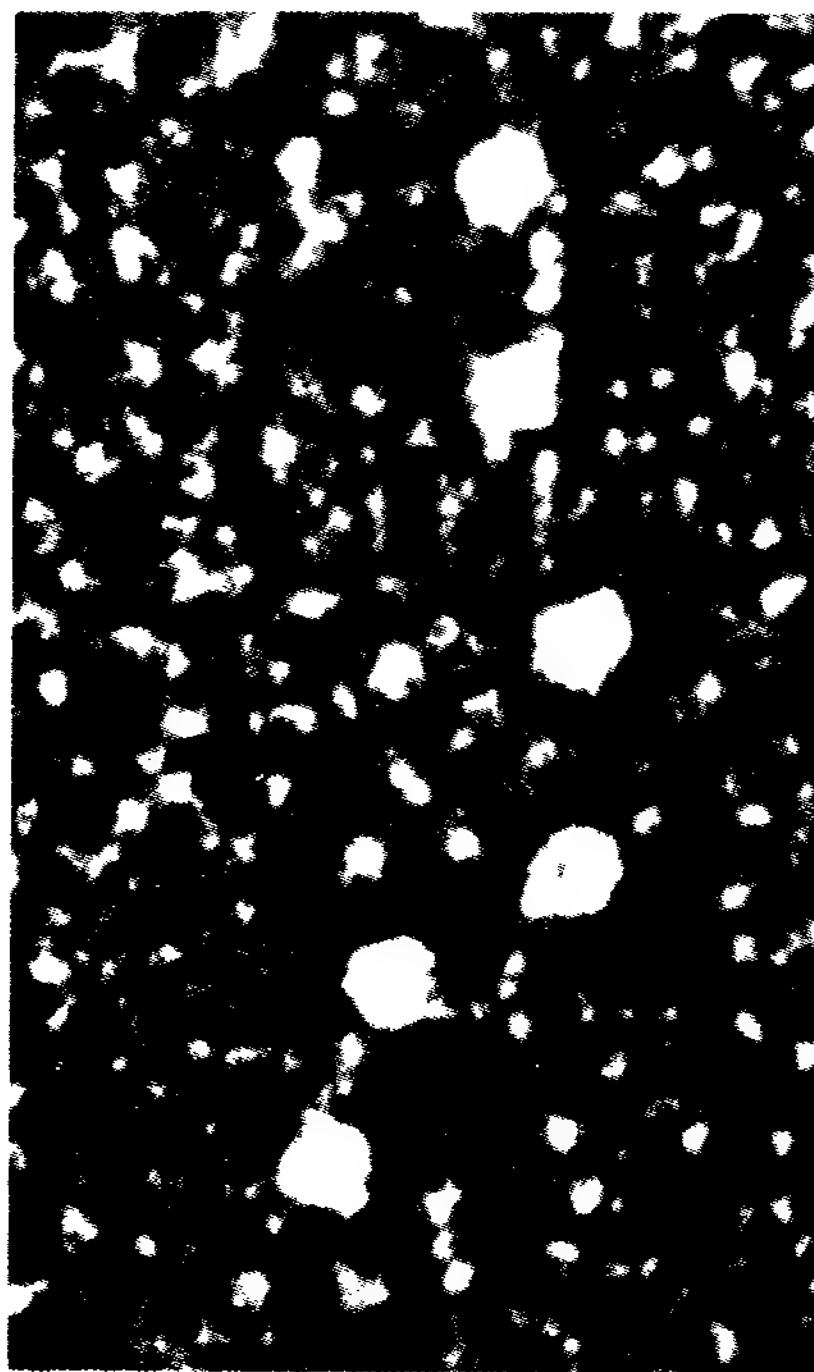


Рис. 6.3. Электронная микрофотография молекул ДНК-полимеразы I (белые сферические частицы), присоединившейся к нитевидной синтетической ДНК-матрице. (Печатается с любезного разрешения д-ра J. Griffith.)

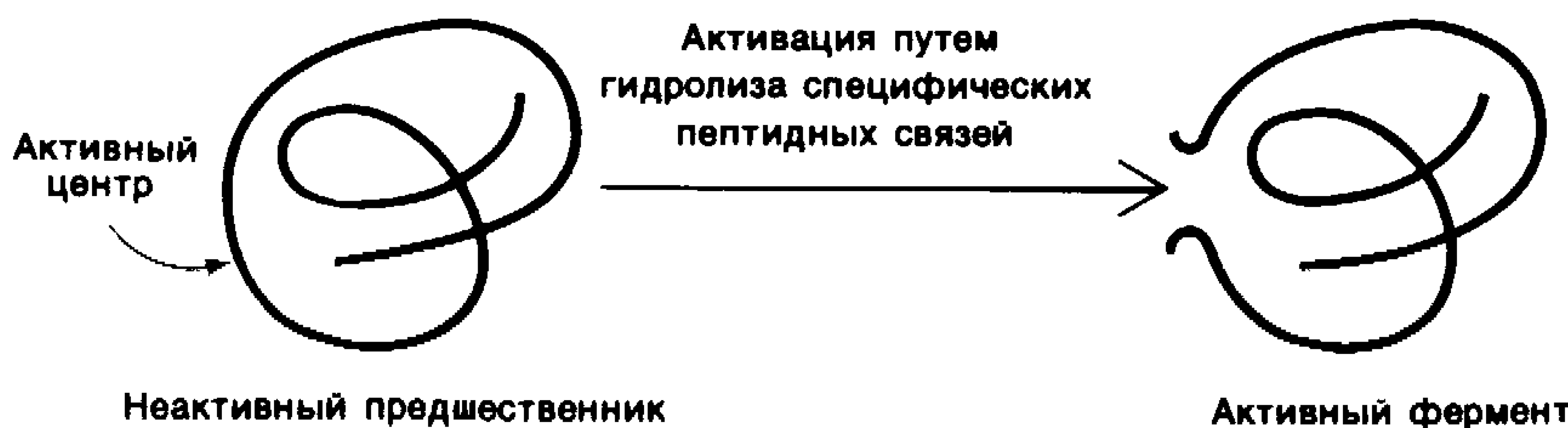
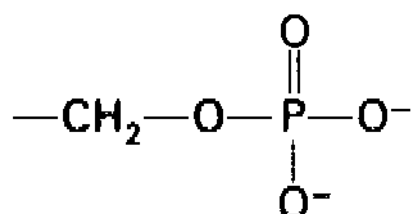


Рис. 6.4. Активация профермента путем гидролиза специфических пептидных связей.

фикации. Так, в частности, путем присоединения фосфорильной группы к определенным остаткам серина регулируется активность ферментов (разд. 16.11), синтезирующих или расщепляющих гликоген.



Фосфорилированное производное остатка серина

Такая модификация может быть обращена гидролизом. Как присоединение, так и отщепление фосфорильных и других модифицирующих групп катализируется специфическими ферментами.

Иной тип регуляции действует в случае многих метаболических последовательностей, ведущих к синтезу небольших молекул, например аминокислот. При этом фермент, катализирующий первый этап биосинтеза, подвергается ингибирующему действию конечного продукта биосинтеза (рис. 6.5). Иллюстрацией этого механизма регуляции – *ингибирования по принципу обратной связи*, или *ретроингибирования*,– может служит биосинтез изолейцина у бактерий. Превращение треонина в изолейцин осуществляется в пять этапов, первый из которых катализируется треониндезаминазой. Когда концентрация изолейцина достигает достаточно высокого уровня, происходит ингибирование фермента, обусловленное тем, что изолейцин присоединяется к регуляторному (а не к каталитическому) участку фермента. Ингибирование фермента в этом случае опосредовано обратимым *аллостерическим взаимодействием*. При снижении содержания изолейцина до определенного уровня треониндезаминаза вновь становится активной и синтез изолейцина восстанавливается.

Специфичность ряда ферментов находится под физиологическим контролем. Особенно интересным примером в этом отношении может служить синтез лактозы в молочной железе (рис. 6.6). Лактозо-синтаза – фермент, катализирующий синтез лактозы, состоит из двух субъединиц – каталитической и модифицирующей. Каталитическая субъединица сама по себе неспособна к синтезу лактозы. Роль этой субъединицы состоит в том, что она катализирует присоединение галактозы к белку, содержащему ковалентно присоединенную углеводную цепь.

Модифицирующая субъединица меняет специфичность каталитической субъединицы таким образом, что последняя начинает присоединять галактозу уже к глюкозе, образуя лактозу. Содержание модифицирующей субъединицы находится под гормональным контролем. Во время беременности в молочной железе синтезируется каталитическая субъединица, содержание же модифицирующей субъединицы незначительно. При родах содержание гормонов в крови резко меняется, что приводит к синтезу больших количеств модифицирующей субъединицы. Далее модифицирующая субъединица присоединяется к каталитической, образуя активный лактозо-синтазный комплекс, продуцирующий большие количества лактозы. Из всего сказанного очевидно, что гормоны могут оказывать физиологический эффект путем изменения специфичности ферментов.

6.4. Ферменты осуществляют трансформацию различных видов энергии

Во многих биохимических реакциях *энергия реагирующих веществ переходит из одной формы в другую с высокой степенью эффективности*. Так, например, при фотосинтезе энергия света превращается в энергию химических связей. В митохондриях свободная энергия, содержащаяся в низкомолекулярных веществах, поступающих с пищей, переходит в энергию аденозинтрифосфата

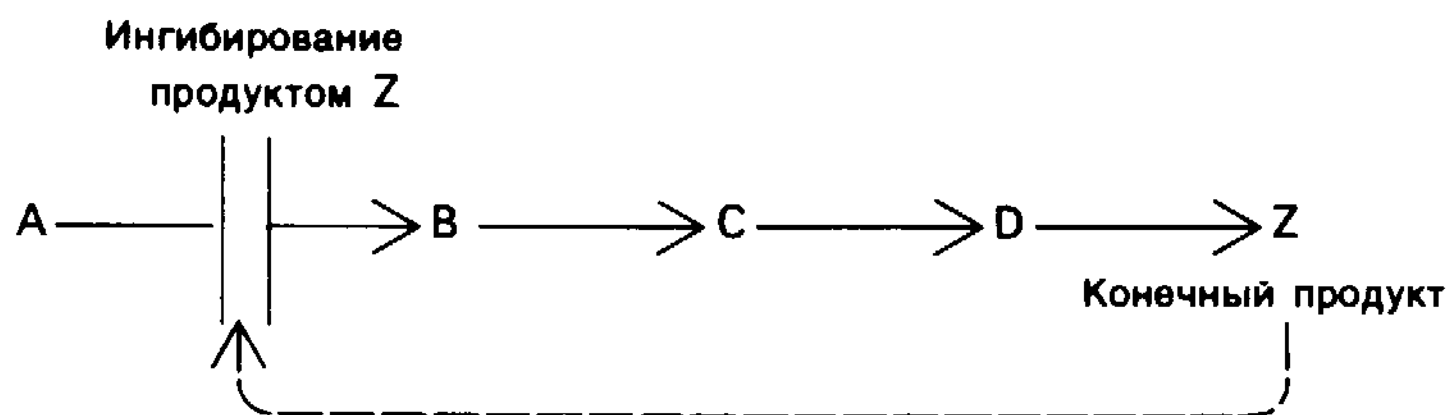


Рис. 6.5. Ингибирование по механизму обратной связи первого в метаболической последовательности фермента путем обратимого связывания им конечного продукта.

(ATP) – разменной монеты энергетической валюты. Энергия химических связей ATP используется далее во многих процессах. При мышечном сокращении энергия ATP преобразуется в энергию мышечного сокращения. В клетках и в субклеточных органеллах имеются насосы, использующие ATP для транспорта молекул и ионов против химического и электрического градиентов. Эти превращения энергии осуществляются молекулами ферментов, составляющими интегральную часть высокоорганизованных структур.

6.5. Ферменты не сдвигают равновесия реакции

Фермент является катализатором, и, следовательно, он не может изменять равновесия химической реакции. Это означает, что фермент ускоряет как прямую, так и обратную реакцию в совершенно одинаковой степени. Рассмотрим взаимопревращение A в B. Пусть в отсутствие фермента скорость прямой реакции ($k_{пр}$) составит $10^{-4}\ с^{-1}$, а скорость обратной ($k_{обр}$) составит $10^{-6}\ с^{-1}$. Константа равновесия K определяется соотношением этих скоростей:

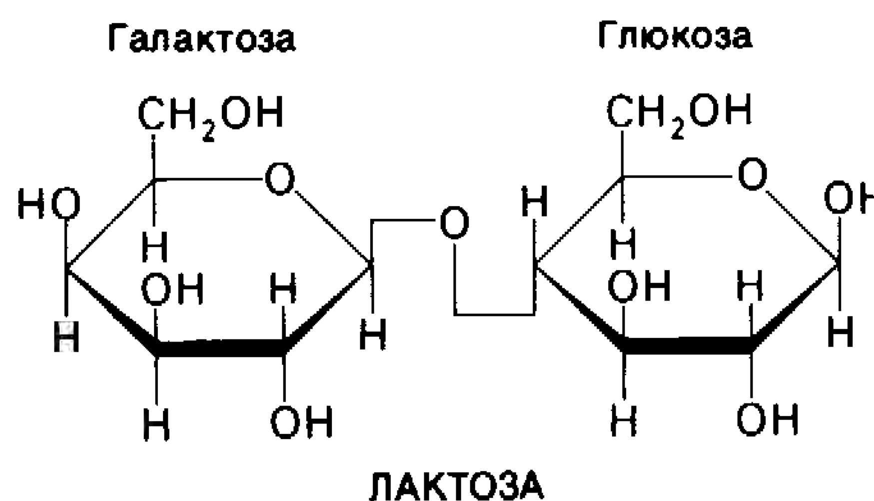
$$A \underset{10^{-6}\ с^{-1}}{\overset{10^{-4}\ с^{-1}}{\rightleftarrows}} B,$$

$$K = \frac{[B]}{[A]} = \frac{k_{пр}}{k_{обр}} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100.$$

Таким образом, в состоянии равновесия концентрация B будет в 100 раз выше, чем концентрация A, независимо от того, присутствует фермент или нет. Однако в отсутствие фермента равновесие установится лишь через несколько часов, тогда как при участии фермента оно будет достигнуто всего лишь за несколько секунд. Следовательно, ферменты ускоряют наступление равновесия, но не сдвигают его.

6.6. Ферменты снижают энергию активации катализируемых ими реакций

Химическая реакция A⇄B протекает через *переходное состояние* с более высокой энер-



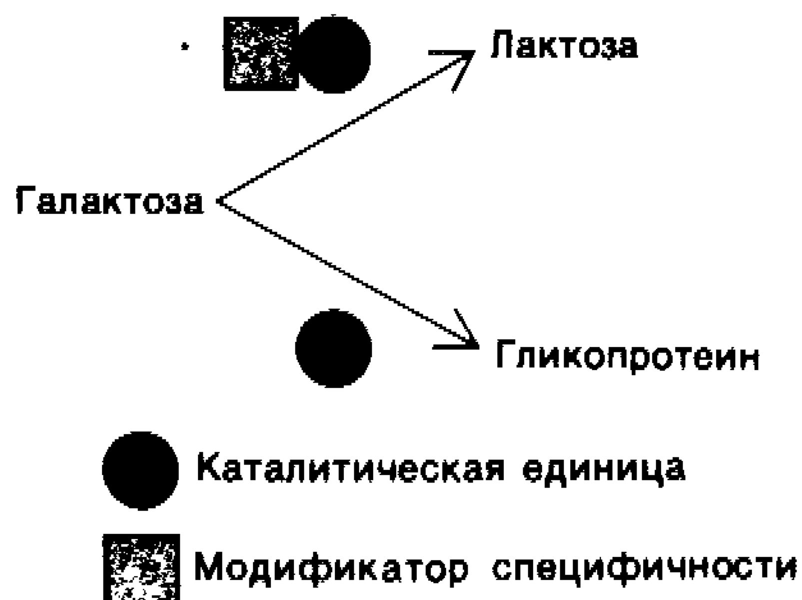


Рис. 6.6. Синтез лактозы – сахара, состоящего из остатков глюкозы и галактозы, происходит под действием фермента, который содержит каталитическую субъединицу и субъединицу, модифицирующую субстратную специфичность. Каталитическая субъединица в отсутствие субъединицы-модификатора катализирует другую реакцию.

гией, чем энергия А или В. Скорость прямой реакции зависит от температуры и от разности значений свободной энергии для А и переходного состояния; эта разность называется *свободной энергией активации Гиббса* и обозначается $\Delta G^{\ddagger}$ (рис. 6.7,*А*):

$$\Delta G^{\ddagger} = G_{\text{переходное состояние}} - G_{\text{субстрат}}$$

Скорость реакции пропорциональна количеству молекул, свободная энергия которых равна или выше $\Delta G^{\ddagger}$. Доля таких молекул возрастает с повышением температуры.

Ферменты повышают скорость реакций путем снижения активационного барьера $\Delta G^{\ddagger}$. При взаимодействии субстрата с ферментом реакция протекает по новому механизму, характеризующемуся более низкой энергией переходного состояния, чем реакции, протекающие в отсутствие фермента (рис. 6.7, *Б*).

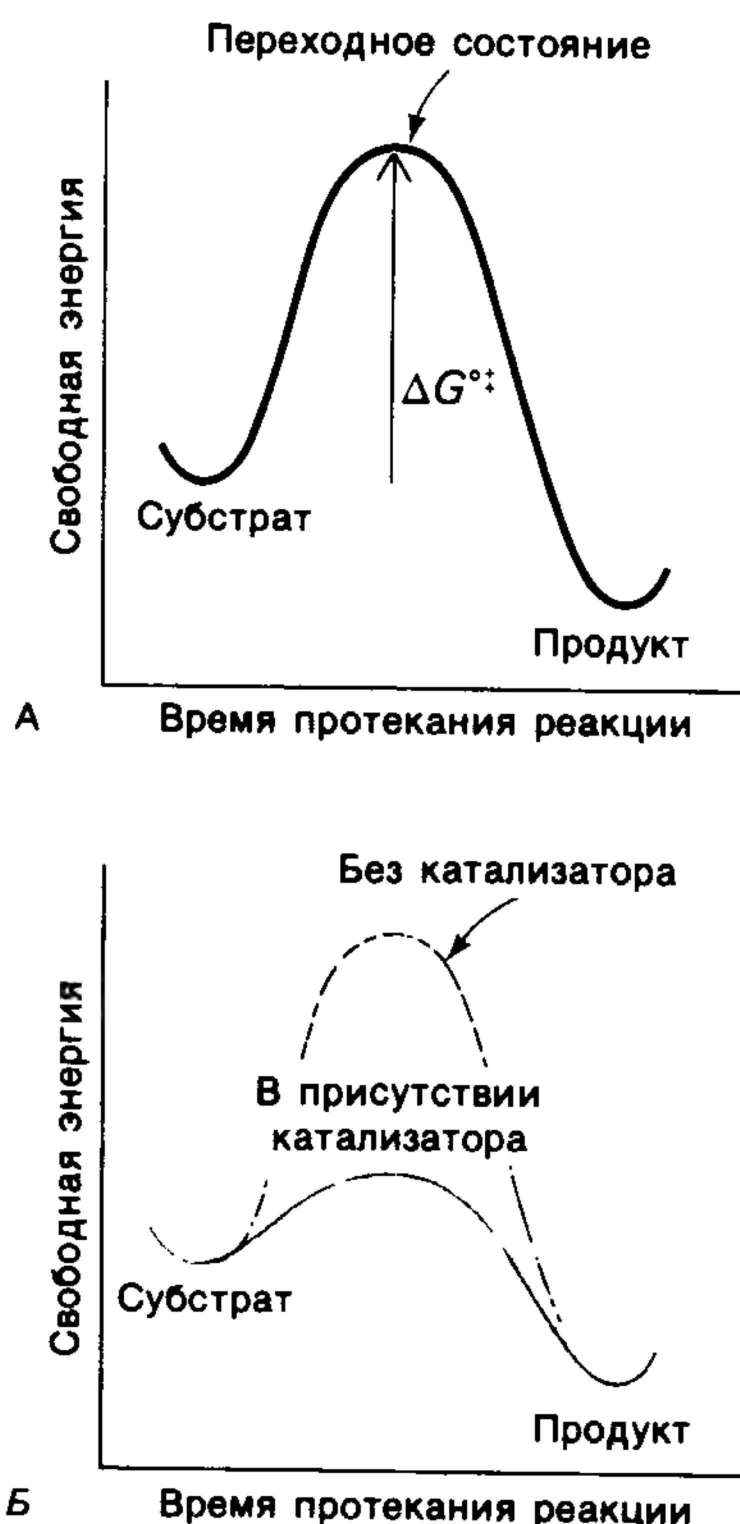


Рис. 6.7. *А*. Определение свободной энергии активации $\Delta G^{\ddagger}$. *Б*. Фермент ускоряет реакцию путем снижения $\Delta G^{\ddagger}$.

6.7. Первый этап ферментативного катализа – образование фермент-субстратного комплекса

Образованию или расщеплению химических связей каким-либо ферментом предшествует формирование *фермент-субстратного* (ES) комплекса. При этом субстрат присоединяется к специфическому участку на ферменте, называемому *активным центром*. Большинство ферментов проявляет высокую избирательность в отношении связывания субстратов. В сущности, специфичность каталитического действия ферментов в основном зависит от специфичности процесса связывания. Более того, на этой стадии нередко осуществляется и регуляция ферментативной активности.

Существование фермент-субстратных комплексов было доказано разными способами.

1. ES-комплексы были *непосредственно выявлены с помощью электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа*. Комплексы нуклеиновых кислот и их полимераз видны под электронным микроскопом (рис. 6.3). При рентгеноструктурном анализе комплекса карбоксипептидазы А с ее субстратом глицил-L-тирозином была получена подробная информация относительно места и характера связывания субстрата с ферментом в этом ES-комплексе.

2. При образовании ES-комплекса нередко изменяются *физические свойства* фермента, например растворимость или термостабильность.

3. *Спектроскопические характеристики* многих ферментов и субстратов изменяются при образовании ES-комплекса подобно тому, как меняется характерный для дезоксигемоглобина спектр поглощения при связывании кислорода или при окислении в ферриформу, что было описано ранее (рис. 3.18). Эти изменения проявляются особенно отчетливо, если фермент содержит окрашенную простетическую группу. Хорошей иллюстрацией может служить триптофан-синтаза – бактериальный фермент, содержащий в качестве простетической группы пиридоксальфосфат. Этот фермент катализирует синтез L-триптофана из L-серина и индола. При добавлении L-серина к ферменту резко возрастает флуоресценция пиридоксальфосфатной группы (рис. 6.8). Последующее добавление второ-

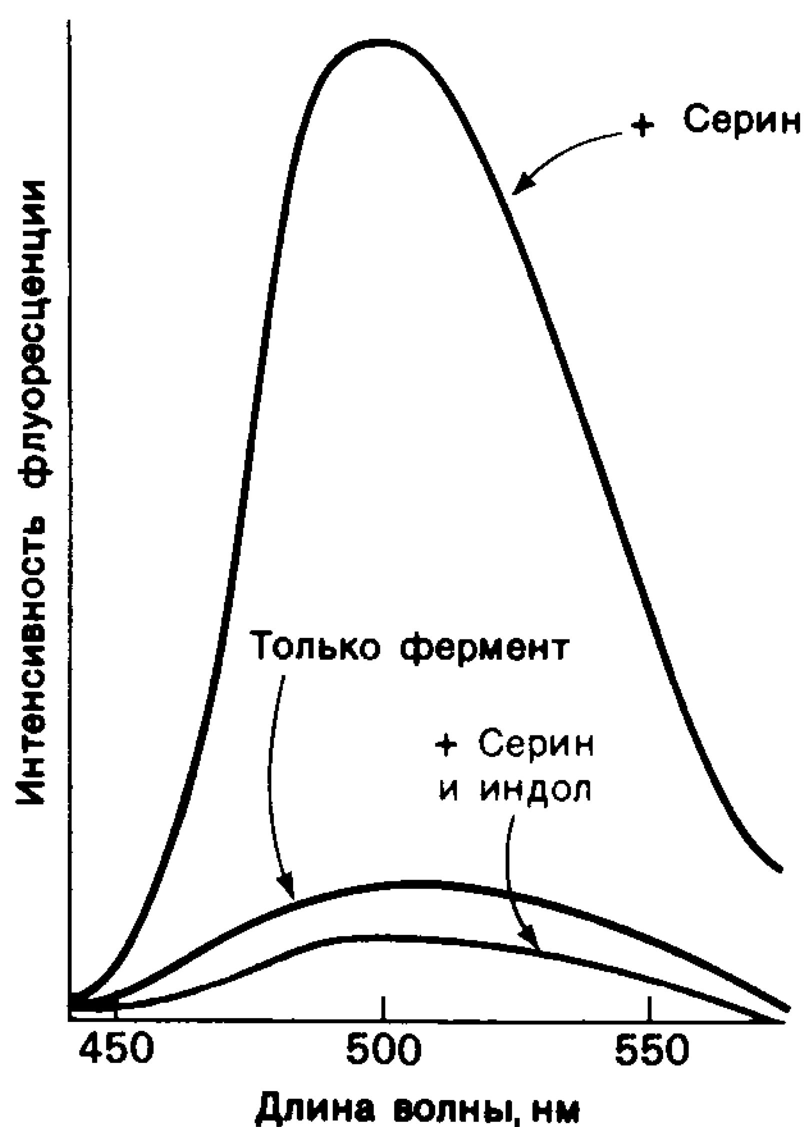


Рис. 6.8. При добавлении субстратов реакции - серина и индола - изменяется интенсивность флуоресценции пиридоксальфосфатной группы в активном центре триптофан-синтазы.

го субстрата - индола - гасит флуоресценцию до уровня ниже исходного. Таким образом, флуоресцентная спектроскопия позволяет выявить существование комплексов фермент—серин и фермент—серин—индол. Для изучения фермент-субстратного взаимодействия с успехом применяются и другие спектроскопические методы, в частности методы ядерного и электронного парамагнитного резонанса.

4. При образовании ES-комплекса проявляется высокая степень *стереоспецифичности.* Например, D-серин *не может* служить субстратом для триптофан-синтазы. Более того, D-изомер даже не связывается с ферментом. Из этого следует, что участок связывания субстрата имеет строго определенную геометрическую форму.

5. ES-комплексы удается иногда *выделить в чистом виде.* Если фермент катализирует реакцию A + B ⇄ C, то в некоторых случаях можно выделить комплекс EA. Для этого необходимо, чтобы фермент обладал достаточно высоким сродством к A и чтобы B в смеси отсутствовал.

6. При постоянной концентрации фермента скорость реакции возрастает с увеличением концентрации субстрата, пока не будет достигнута максимальная скорость (рис. 6.9). Такой эффект насыщения не свойствен реакциям, протекающим без катализатора. В 1913 г. Леонор Михаэлис (L. Michaelis) рассмотрел понятие *максимальной скорости ферментативной реакции* с позиций образования дискретного ES-комплекса. Михаэлис пришел к выводу, что скорость реакции достигает максимума при достаточно высокой концентрации субстрата, так как в этих условиях субстрат занимает все каталитические центры на ферменте. Это положение является самым старым и наиболее общим доводом в пользу существования ES-комплексов.

6.8. Некоторые свойства активных центров

Активный центр фермента - это участок, который связывает субстраты (и простетическую группу, если она есть) и в котором содержатся аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в образовании или разрыве химических связей. Такие остатки называют *каталитическими группами.* Несмотря на огромное разнообразие структуры ферментов, их специфичности и механизма каталитического действия, все же можно сделать ряд обобщений в отношении свойств активных центров.

1. *На активный центр приходится относительно малая часть общего объема фермента.* Бóльшая часть аминокислотных остатков в молекуле фермента не контактирует с субстратом. Остается загадкой, поче-

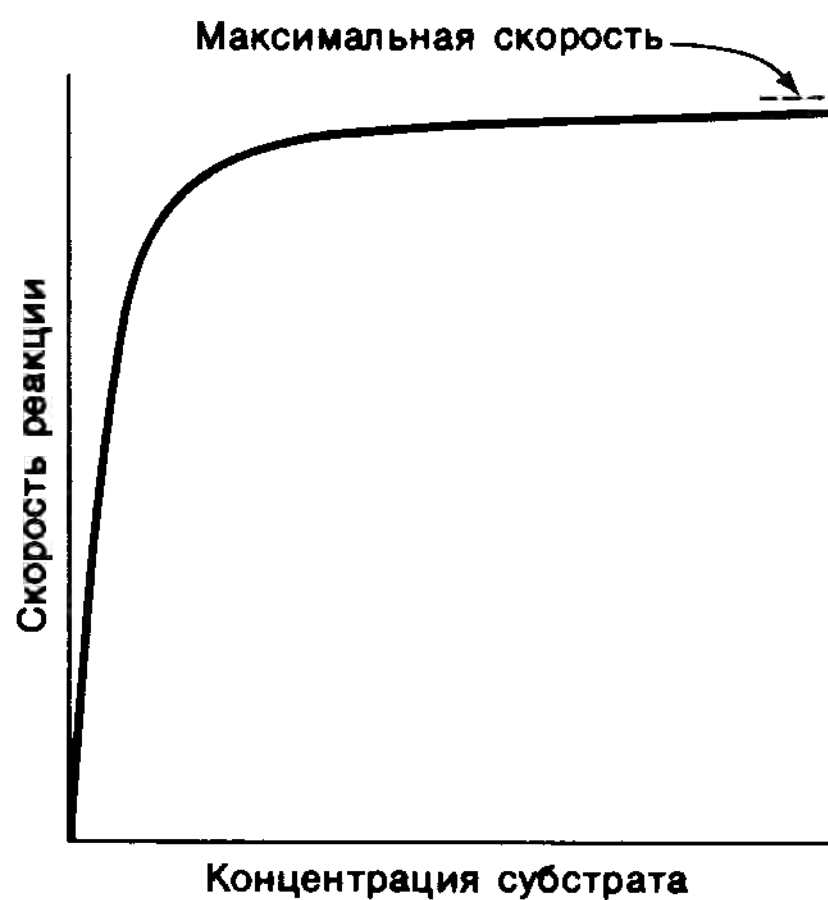


Рис. 6.9. Скорость ферментативной реакции как функция концентрации субстрата.

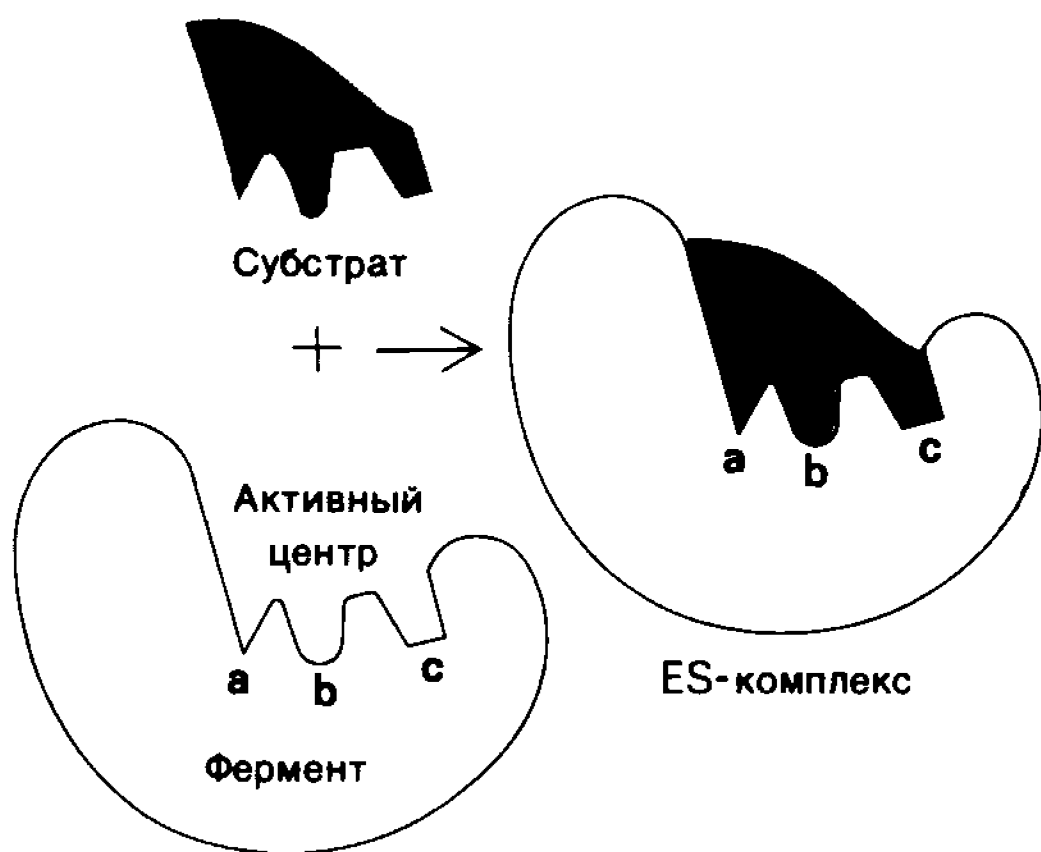


Рис. 6.10. Взаимодействие субстратов с ферментами согласно *модели ключ-замок*. Активный центр фермента сам по себе комплементарен по форме субстрату.

му размер ферментов так велик. Почти все ферменты содержат более 100 аминокислотных остатков и имеют массу свыше 10 кДа, а диаметр – свыше 25 Å.

2. *Активный центр – трехмерное образование.* Другими словами, это не точка, не линия и даже не плоскость, а сложная трехмерная структура, в формировании которой участвуют группы, принадлежащие разным частям линейной последовательности аминокислот. Действительно, как мы уже видели на примере гемоглобина и миоглобина, взаимодействие между аминокислотными остатками, расположенными далеко друг от друга в линейной последовательности, нередко сильнее, чем взаимодействие между соседними (в последовательности) остатками аминокислот. В лизоциме – ферменте, который мы рассмотрим подробно в следующей главе, основные группы активного центра представлены аминокислотными остатками, занимающими 35, 52, 62, 63 и 101-е положения в линейной последовательности из 129 аминокислот.

3. *Субстраты относительно слабо связываются с ферментами.* Константы равновесия ES-комплексов обычно лежат в пределах от 10^{-2} до 10^{-8} М, что соответствует свободным энергиям взаимодействия от −3 до −12 ккал/моль. Сравним эти величины с силой ковалентных связей, составляющей от −50 до −110 ккал/моль.

4. *Активный центр имеет форму узкого углубления или щели.* Во всех ферментах с изученной структурой связывание субстратов происходит в таком углублении или щели, куда нет доступа воде, за исключением тех случаев, когда вода является одним из реагирующих веществ. В этом углублении присутствует несколько полярных аминокислотных остатков, необходимых для связывания и катализа. Неполярный характер всей области в целом способствует связыванию субстрата. Кроме того, щелевидная форма активного центра создает микроокружение, в котором отдельные полярные остатки приобретают особые свойства, существенно важные для катализа.

5. *Специфичность связывания зависит от строго определенного расположения атомов в активном центре.* Субстрат входит в активный центр, только если он соответствует ему по форме. В 1890 г. Эмиль Фишер (E. Fischer) использовал сравнение с ключом и замком (рис. 6.10), которое оказалось по существу правильным и исключительно плодотворным представлением о стереоспецифичности катализа. Однако, как показывают работы последних лет, активные центры некоторых ферментов не являются жесткой структурой, их форма модифицируется при связывании субстратов. В этих ферментах форма активного центра становится комплементарной форме субстрата

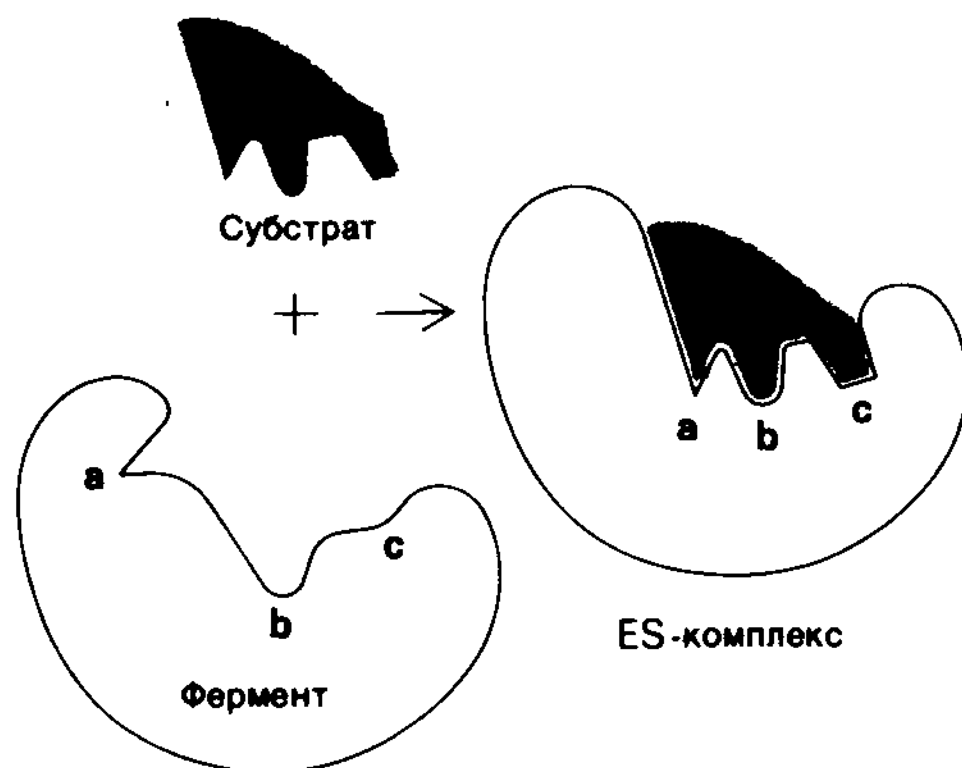


Рис. 6.11. Взаимодействие субстратов с ферментами согласно *модели индуцированного соответствия.* При связывании субстрата происходит изменение формы фермента. Активный центр фермента только *после* присоединения субстрата становится комплементарным ему по форме.

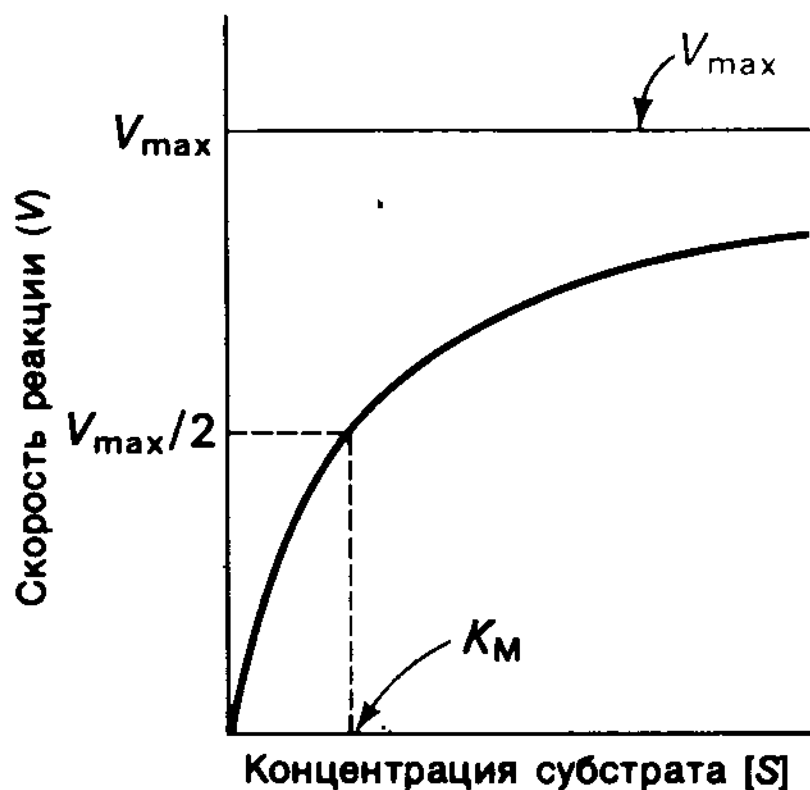
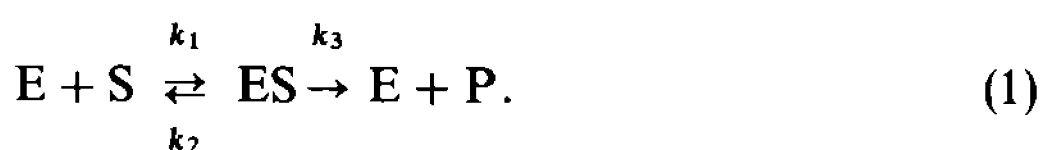


Рис. 6.12. График зависимости скорости реакции V от концентрации субстрата [S] для фермента, подчиняющегося кинетике Михаэлиса – Ментен (V_{max} – максимальная скорость, K_M – константа Михаэлиса).

только *после* связывания субстрата. Такой процесс динамического узнавания называют *индукцией соответствия* (рис. 6.11). Кроме того, некоторые ферменты предпочтительно связывают субстрат в напряженной («искаженной») форме, соответствующей переходному состоянию.

6.9. Кинетика многих ферментов описывается моделью Михаэлиса – Ментен

Для многих ферментов скорость катализа V, таким образом, зависит от концентрации субстрата [S], как это показано на рис. 6.12. При постоянной концентрации фермента и малых значениях [S] V почти прямо пропорциональна [S]. При высоких значениях [S] V почти не зависит от [S]. В 1913 г. Леонор Михаэлис и Мод Ментен (L. Michaelis, M. Menten) предложили простую модель, объясняющую такую кинетику. Основная их посылка состояла в том, что образование специфического фермент-субстратного комплекса является необходимым промежуточным этапом катализа. Предложенная ими модель, которая простейшим образом описывает кинетические свойства многих ферментов, состоит в следующем:



$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_3} E + P. \qquad (1)$$

Фермент E соединяется с субстратом S, образуя ES-комплекс; константа скорости этого процесса – k_1. Судьба ES-комплекса складывается двояко: он может либо диссоциировать на E и S с константой скорости k_2, либо подвергаться дальнейшему превращению, образуя продукт P, с константой скорости k_3. Постулируется, что продукт реакции P не превращается в исходный субстрат S; это условие соблюдается на начальной стадии реакции, пока концентрация продукта не достигает ощутимого количества.

Как связана скорость катализа с концентрацией субстрата и фермента и скоростями отдельных этапов реакции? Начнем с того, что скорость ферментативной реакции равна произведению концентрации комплекса ES на константу k_3:

$$V = k_3 [ES]. \qquad (2)$$

Выразим [ES] через известные величины. Скорости образования и распада ES составляют:

$$\text{Скорость образования ES} = k_1 [E][S]. \qquad (3)$$

$$\text{Скорость распада ES} = (k_2 + k_3)[ES]. \qquad (4)$$

Определим скорость катализа в стационарных условиях. *Стационарные условия* характеризуются тем, что концентрация промежуточных продуктов остается постоянной, тогда как концентрации исходных и конечных продуктов меняются. Это имеет место в том случае, когда скорость синтеза ES-комплекса оказывается равной скорости его распада. Если левые части равенств (3) и (4) равны между собой, то равны и правые, т.е.

$$k_1 [E][S] = (k_2 + k_3)[ES]. \qquad (5)$$

Преобразуем это уравнение:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2 + k_3)/k_1}. \qquad (6)$$

Уравнение (6) можно упростить, если ввести новую константу K_M, называемую *константой Михаэлиса*:

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}. \qquad (7)$$

Введем K_M в уравнение (6):

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M}. \qquad (8)$$

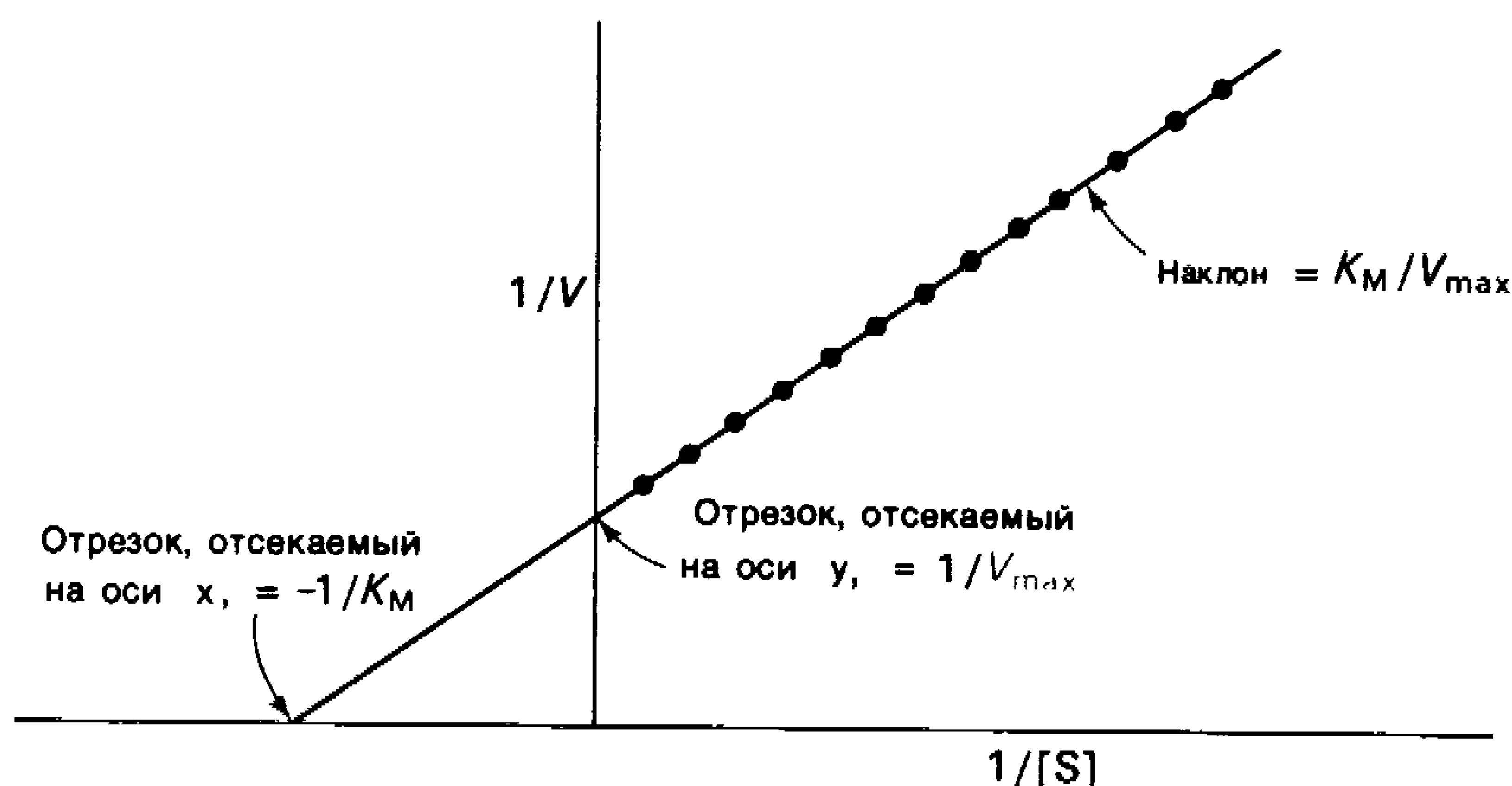


Рис. 6.13. Изображение кинетики ферментативной реакции на графике двойных обратных величин: $1/V$ выражена как функция $1/[S]$. Наклон кривой равен K_M/V_{max}, точка пересечения с осью y соответствует $1/V_{max}$, точка пересечения с осью $x - 1/K_M$.

Рассмотрим числитель в последнем выражении. Концентрация несвязанного субстрата [S] практически равна общей концентрации субстрата при условии, что концентрация фермента значительно ниже концентрации субстрата. Концентрация несвязанного фермента (E) равна общей концентрации фермента E_T минус концентрация комплекса ES:

$$[E] = [E_T] - [ES]. \tag{9}$$

Подставим это выражение в уравнение (8):

$$[ES] = ([E_T] - [ES])[S]/K_M. \tag{10}$$

Решение уравнения (10) относительно [ES] дает

$$[ES] = [E_T]\frac{[S]/K_M}{1 + [S]/K_M} \tag{11}$$

или

$$[ES] = [E_T]\frac{[S]}{[S] + K_M}. \tag{12}$$

Подставим выражение (12) в уравнение (2):

$$V = k_3[E_T]\frac{[S]}{[S] + K_M}. \tag{13}$$

Максимальная скорость реакции V_{max} достигается при насыщении активных центров фермента субстратом, т. е. когда [S] намного выше K_M; при этом условии $[S]/([S] + K_M)$ приближается к единице. Следовательно,

$$V_{max} = k_3[E_T]. \tag{14}$$

Подставив это выражение в выражение (13), мы получим уравнение Михаэлиса - Ментен:

$$V = V_{max}\frac{[S]}{[S] + K_M}. \tag{15}$$

Это уравнение соответствует кинетическим данным, представленным на рис. 6.12. При низких концентрациях субстрата, когда [S] намного ниже K_M, $V = [S]\,V_{max}/K_M$, т. е. скорость прямо пропорциональна концентрации субстрата. При высоких концентрациях субстрата, когда [S] намного выше, чем K_M, $V = V_{max}$, т. е. скорость реакции максимальна и не зависит от концентрации субстрата.

Значение K_M выступает с очевидностью из уравнения (15). Если $[S] = K_M$, то $V = V_{max}/2$. Таким образом, K_M *равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной.*

6.10. V_{max} и K_M можно определить, используя различные концентрации субстрата

Если фермент работает в соответствии с простой схемой, представленной в уравнении (1), то нетрудно определить его константу Михаэлиса K_M и максимальную скорость V_{max} путем измерения скорости реакции при различных концентрациях субстрата. Удобно преобразовать уравнение Михаэлиса—Ментен в такую форму, чтобы графически

оно выражалось прямой. Для этого уравнение (15) представляют в виде обратных величин:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}. \qquad (16)$$

Откладывая $1/V$ против $1/[S]$, получаем прямую, пересечение которой с осью ординат дает $1/V_{max}$, а угол наклона равен K_M/V_{max} (рис. 6.13).

6.11. Значение величин K_M и V_{max}

K_M для разных ферментов варьирует в широком диапазоне величин (табл. 6.1). Для большинства ферментов величина K_M лежит в пределах $10^{-1} - 10^{-6}$ М. Значение K_M фермента зависит от природы субстрата, а также от условий среды: температуры, ионной силы. Константа Михаэлиса K_M имеет два смысловых значения. Во-первых, K_M – это концентрация субстрата, при которой занята половина активных центров фермента. Если известна K_M, то можно рассчитать, какова доля занятых активных центров f_{ES} для любой концентрации субстрата:

$$f_{ES} = \frac{V}{V_{max}} = \frac{[S]}{[S] + K_M}. \qquad (17)$$

Во-вторых, K_M связана с константами скоростей отдельных этапов катализа, представленных в уравнении (1). Согласно уравнению (7), K_M равна $(k_2 + k_3)/k_1$. Рассмотрим крайний случай, когда k_2 намного выше k_3, т.е. диссоциация комплекса ES на E и S происходит гораздо быстрее, чем образование E плюс продукта реакции. В этих условиях ($k_2 \gg k_3$)

$$K_M = \frac{k_2}{k_1}. \qquad (18)$$

Константа диссоциации комплекса ES описывается уравнением

$$K_{ES} = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2}{k_1}. \qquad (19)$$

Другими словами, *если k_3 намного меньше, чем k_2, то K_M равна константе диссоциации ES-комплекса*. При указанном условии K_M служит мерой прочности ES-комплекса: высокая K_M – показатель слабого связывания субстрата; низкая K_M – показатель сильного фермент-субстратного взаимодействия. Следует еще раз подчеркнуть, что по значению K_M можно судить о сродстве фермента к субстрату только при условии, что k_2 значительно больше k_3. В действительности так оно и бывает во многих, хотя и не во всех случаях.

Максимальная скорость V_{max} отражает число оборотов фермента, если известна концентрация активных центров (E_T), так как

$$V_{max} = k_3 [E_T]. \qquad (20)$$

Например, при полном насыщении субстратом растворенная карбоангидраза в концентрации 10^{-6} М катализирует образование 0,6 М H_2CO_3 в секунду. Отсюда $k_3 = 6 \cdot 10^{-5}$ $с^{-1}$. Кинетическая константа k_3 называется *числом оборотов*. Число оборотов фермента – это *то количество молекул субстрата, которое превращается в продукт реакции в единицу времени при полном насыщении фермента субстратом*. Число оборотов $6 \cdot 10^5$ $с^{-1}$, характерное для карбоангидразы, – самое большое из всех известных. Каждый новый каталитический акт происходит через промежуток времени, равный $1/k_3$, что для карбоангидразы составляет 1,7 мкс. Число оборотов большинства ферментов при использовании физиологических субстратов находится в пределах 10^4 в секунду (табл. 6.2).

Таблица 6.1. Величины K_M некоторых ферментов

Фермент	Субстрат	K_M, М
Химотрипсин	Ацетил-L-триптофанамид	$5 \cdot 10^{-3}$
Лизоцим	Гекса-N-ацетилглюкозамин	$6 \cdot 10^{-6}$
β-Галактозидаза	Лактоза	$4 \cdot 10^{-3}$
Треониндезаминаза	Треонин	$5 \cdot 10^{-3}$
Карбоангидраза	CO_2	$8 \cdot 10^{-3}$
Пенициллиназа	Бензилпенициллин	$5 \cdot 10^{-5}$
Пируваткарбоксилаза	Пируват	$4 \cdot 10^{-4}$
	HCO_3^-	$1 \cdot 10^{-3}$
	ATP	$6 \cdot 10^{-5}$
Аргинин-тРНК—синтетаза	Аргинин	$3 \cdot 10^{-6}$
	тРНК	$4 \cdot 10^{-7}$
	ATP	$3 \cdot 10^{-4}$

6.12. О степени совершенства кинетики ферментативного катализа судят по критерию $k_{кат}/K_M$

Когда концентрация субстрата намного превышает K_M, скорость катализа численно равна k_3, т. е. числу оборотов, как это описано в предыдущем разделе. Однако в физиологических условиях концентрации субстратов в большинстве случаев ниже насыщающих. Отношение $[S]/K_M$ обычно колеблется от 0,1 до 1,0. Если $[S] \ll K_M$, то скорость ферментативной реакции значительно ниже k_3, поскольку большинство активных центров остается свободным. Существуют ли такие параметры, с помощью которых можно описать кинетику ферментативных реакций в этих условиях? Такие параметры имеются и их можно получить, объединив уравнения (2) и (8):

$$V = \frac{k_3}{K_M}[E][S]. \quad (21)$$

Если $[S] \ll K_M$, то концентрация свободного фермента (E) практически равна общей концентрации фермента $[E_T]$, и тогда

$$V = \frac{k_3}{K_M}[S][E_T]. \quad (22)$$

Таким образом, *при* $[S] \ll K_M$ *скорость ферментативной реакции зависит от величины* k_3/K_M *и от* $[S]$.

В каких границах лежит отношение k_3/K_M? Обратите внимание, что оно зависит от k_1, k_2 и k_3, как можно это показать путем замещения K_M:

$$\frac{k_3}{K_M} = \frac{k_3 k_1}{k_2 + k_3}. \quad (23)$$

Предел, которого может достичь отношение k_3/K_M, определяется значением k_1, т. е. скоростью образования комплекса ES. *Эта скорость не может превышать число столкновений фермента с субстратом, контролируемое скоростью диффузии.* Из-за этого накладываемого диффузией ограничения значение k_1 не может быть выше 10^8–10^9 $M^{-1}c^{-1}$. Отсюда следует, что верхний предел отношения k_3/K_M составляет 10^8–10^9 $M^{-1}c^{-1}$.

Это ограничение сохраняет свою силу и применительно к ферментам, имеющим более сложный механизм реакции, чем тот, что описан в уравнении (1). В случае таких ферментов максимальная скорость катализа при насыщающих концентрациях субстрата, обозначаемая $k_{кат}$, зависит не от одной k_3, а от нескольких констант скоростей. Параметром, характеризующим эти ферменты, является $k_{кат}/K_M$. *Для ряда ферментов, в частности для ацетилхолинэстеразы, карбоангидразы и триозофосфатизомеразы, отношение* $k_{кат}/K_M$ *колеблется от* 10^8 *до* 10^9 $M^{-1}c^{-1}$, *что свидетельствует о достижении ими практически совершенной кинетики: скорость катализируемых ими реакций ограничивается только частотой столкновения фермента с субстратом.* Дальнейшее повышение скорости реакции возможно только на основе уменьшения времени диффузии. В действительности часто бывает так, что ферменты, обеспечивающие отдельные метаболические последовательности, организованы в сложные комплексы (разд. 13.10), благодаря чему продукт реакции, катализируемой одним ферментом, быстро попадает на следующий фермент. Таким образом, ограничения, накладываемые скоростью диффузии в растворе, частично снимаются тем обстоятельством, что субстраты и продукты оказываются в малом объеме на полиферментном комплексе.

6.13. Ферменты могут ингибироваться специфическими молекулами

Ингибирование ферментативной активности небольшими специфическими молекулами и ионами имеет очень важное значение, поскольку в биологических системах служит

Таблица 6.2. **Максимальное число оборотов некоторых ферментов**

Фермент	Число оборотов (в расчете на 1 с)
Карбоангидраза	600 000
3-Оксостероид-изомераза	280 000
Ацетилхолинэстераза	25 000
Пенициллиназа	2 000
Лактатдегидрогеназа	1 000
Химотрипсин	100
ДНК-полимераза I	15
Триптофансинтаза	2
Лизоцим	0,5

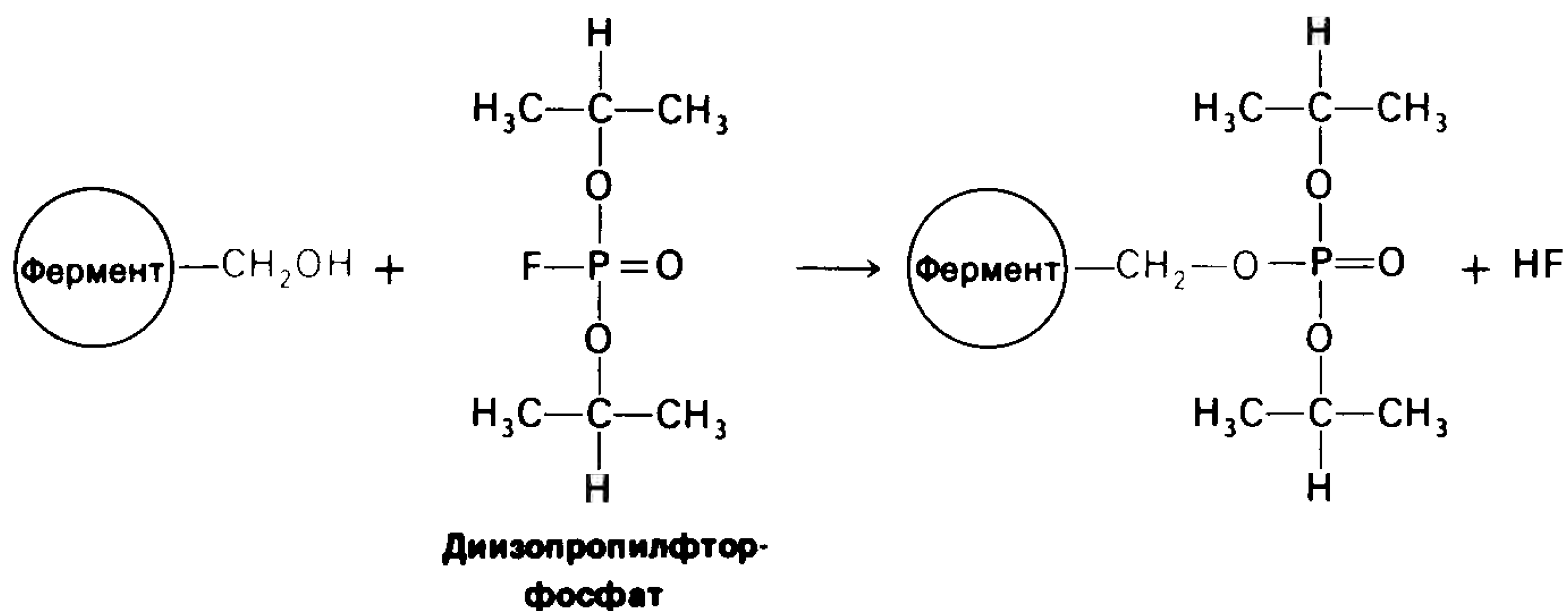
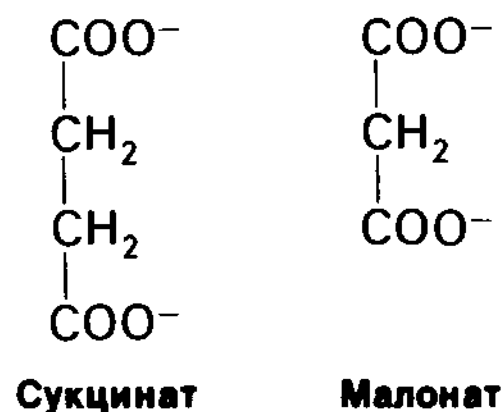


Рис. 6.14. Инактивация химотрипсина и ацетилхолинэстеразы диизопропилфторфосфатом.

основным механизмом контроля. Подавление ферментативной активности лежит также в основе действия многих лекарственных веществ и токсических агентов. Наконец, анализ ингибирования ферментов является одним из подходов к изучению механизмов ферментативного действия. Ингибирование ферментов может быть как обратимым, так и необратимым. При *необратимом ингибировании* ингибитор ковалентно соединяется с ферментом или же связывается так прочно, что диссоциация идет очень медленно. Пример необратимого ингибирования — действие нервнопаралитических ядов на ацетилхолинэстеразу, играющую важную роль в передаче нервных импульсов. Одно из таких отравляющих веществ - диизопропилфторфосфат - взаимодействует с имеющим критическое значение остатком серина в активном центре фермента с образованием неактивного комплекса диизопропилфосфорил — фермент (рис. 6.14). Алкилирующие агенты, например иодоацетамид, способны к необратимому ингибированию ферментов путем модификации цистеина и других боковых цепей (рис. 6.15).

В отличие от рассмотренной ситуации при *обратимом ингибировании* равновесие между ингибитором и ферментом устанавливается быстро. Простейший вид обратимого ингибирования - это конкурентное ингибирование. *Конкурентный ингибитор* похож на субстрат и потому связывается активным центром фермента (рис. 6.16). Это препятствует связыванию субстрата в том же активном центре. Иными словами, невозможно одновременное связывание субстрата и конкурентного ингибитора. *Конкурентный ингибитор уменьшает скорость катализа путем снижения доли молекул фермента, связавших субстрат.* Классический пример конкурентного ингибирования - действие малоната на сукцинат-дегидрогеназу - фермент, отщепляющий от сукцината ионы водорода. Малонат отличается от сукцината тем, что имеет не две метильные группы, а одну:



Физиологически важный пример конкурентного ингибирования связан с образованием 2,3-бисфосфоглицерата из 1,3-бисфосфоглицерата. Фермент, катализирующий эту изомеризацию, - бисфосфоглицератмутаза - конкурентно ингибируется низкими концентрациями 2,3-бисфосфоглицерата.

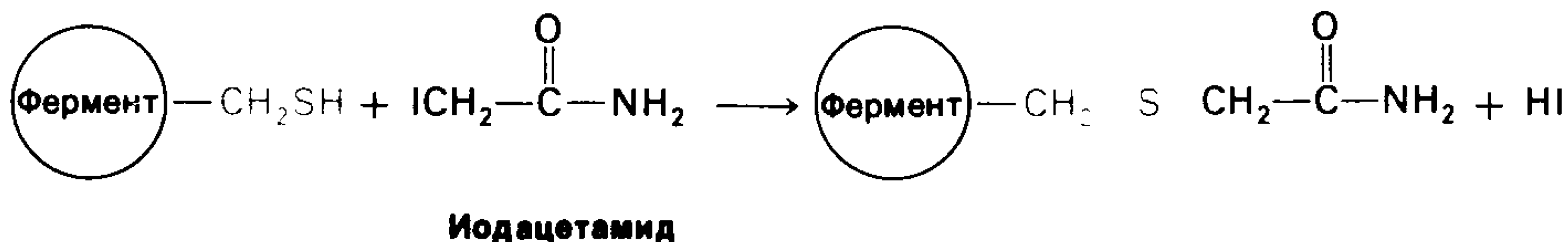


Рис. 6.15. Инактивация иодоацетатом фермента, для активации которого остаток цистеина имеет критическое значение.

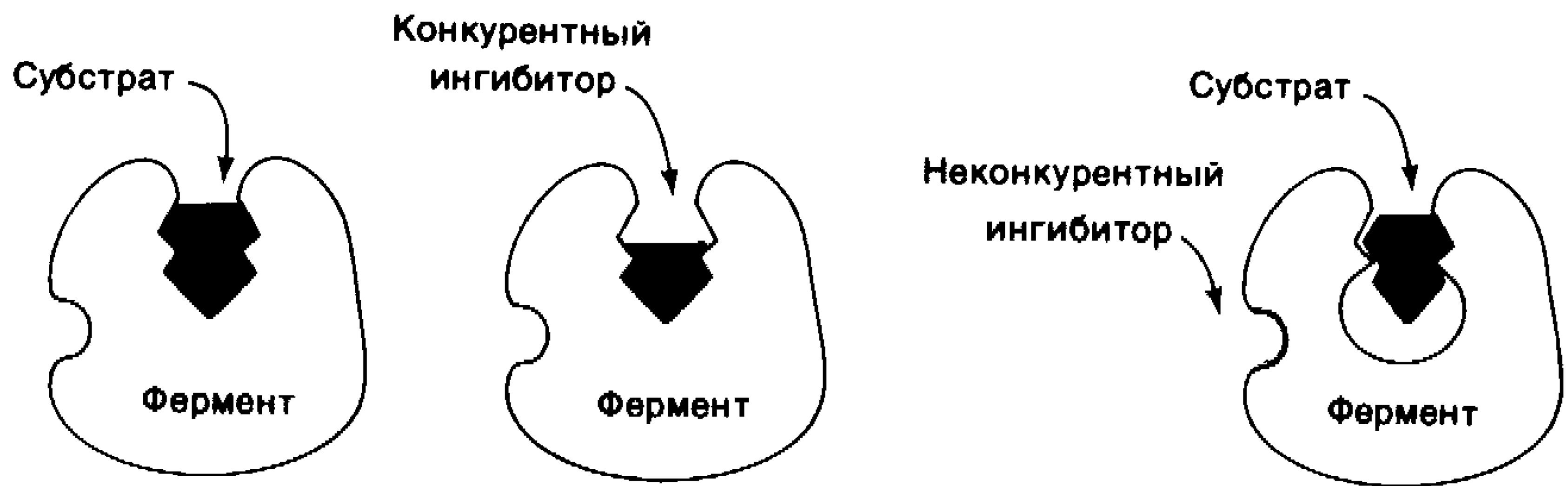
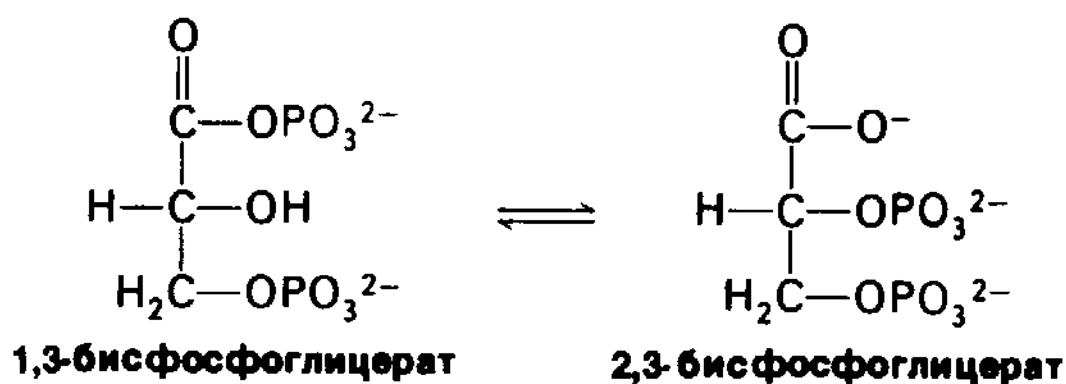


Рис. 6.16. Различие между *конкурентным* и *неконкурентным* ингибитором: слева – фермент-субстратный комплекс; в середине – конкурентный ингибитор препятствует связыванию субстрата; справа – неконкурентный ингибитор не препятствует связыванию субстрата.

В сущности, это довольно обычное явление, когда продукт ферментативной реакции ведет себя как конкурентный ингибитор в силу структурного сходства с субстратом.

При *неконкурентном, но тоже обратимом ингибировании* ингибитор и субстрат могут связываться молекулой фермента одновременно; само по себе это показывает, что участки их связывания не перекрываются. Действие неконкурентного ингибитора заключается в уменьшении числа оборотов фермента, а не в снижении доли связавших субстрат молекул фермента. Возможны и более сложные механизмы ингибирования, когда ингибитор влияет и на связывание субстрата, и на число оборотов фермента.

Активность фермента может быть ингибирована также в результате взаимодействия между разными субъединицами олигомерного фермента. Этот тип ингибирования, называемый *аллостерическим ингибированием*, имеет очень важное значение для физиологических процессов. Мы его рассмотрим несколько ниже.

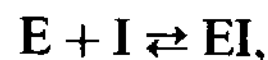


6.14. Конкурентное и неконкурентное ингибирование различаются по кинетике

Измерение скоростей катализа при разных концентрациях субстрата дает возможность отличить конкурентное ингибирование от неконкурентного. При *конкурентном ингибировании* на графике, где $1/V$ отложена против $1/[S]$, прямая пересекает ось ординат в одной и той же точке независимо от присутствия ингибитора; меняется только угол наклона прямой (рис. 6.17). Это показывает, что при конкурентном ингибировании V_{max} не изменяется. *Особенность конкурентного ингибирования состоит в том, что при достаточно высокой концентрации субстрата ингибирование может быть преодолено.* В самом деле, субстрат и ингибитор конкурируют за один и тот же участок. При достаточно высокой концентрации субстрата почти все активные центры заняты субстратом и фермент проявляет полную активность. Увеличение угла наклона прямой на графике зависимости $1/V$ от $1/[S]$ указывает на прочность связи конкурентного ингибитора. В присутствии конкурентного ингибитора уравнение (16) заменяется следующим:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}}\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)\left(\frac{1}{[S]}\right), \qquad (24)$$

где $[I]$ – концентрация ингибитора, а K_i – константа диссоциации комплекса фермент – ингибитор



$$E + I \rightleftarrows EI,$$

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}. \qquad (25)$$

Другими словами, в присутствии конкурентного ингибитора наклон прямой увеличивается на величину $\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$. Рассмотрим фермент с K_M, равной 10^{-4} М. В отсутствие ингибитора $V = V_{max}/2$ при $[S] = 10^{-4}$ М. В присутствии $2 \cdot 10^{-3}$ М конкурентного ин-

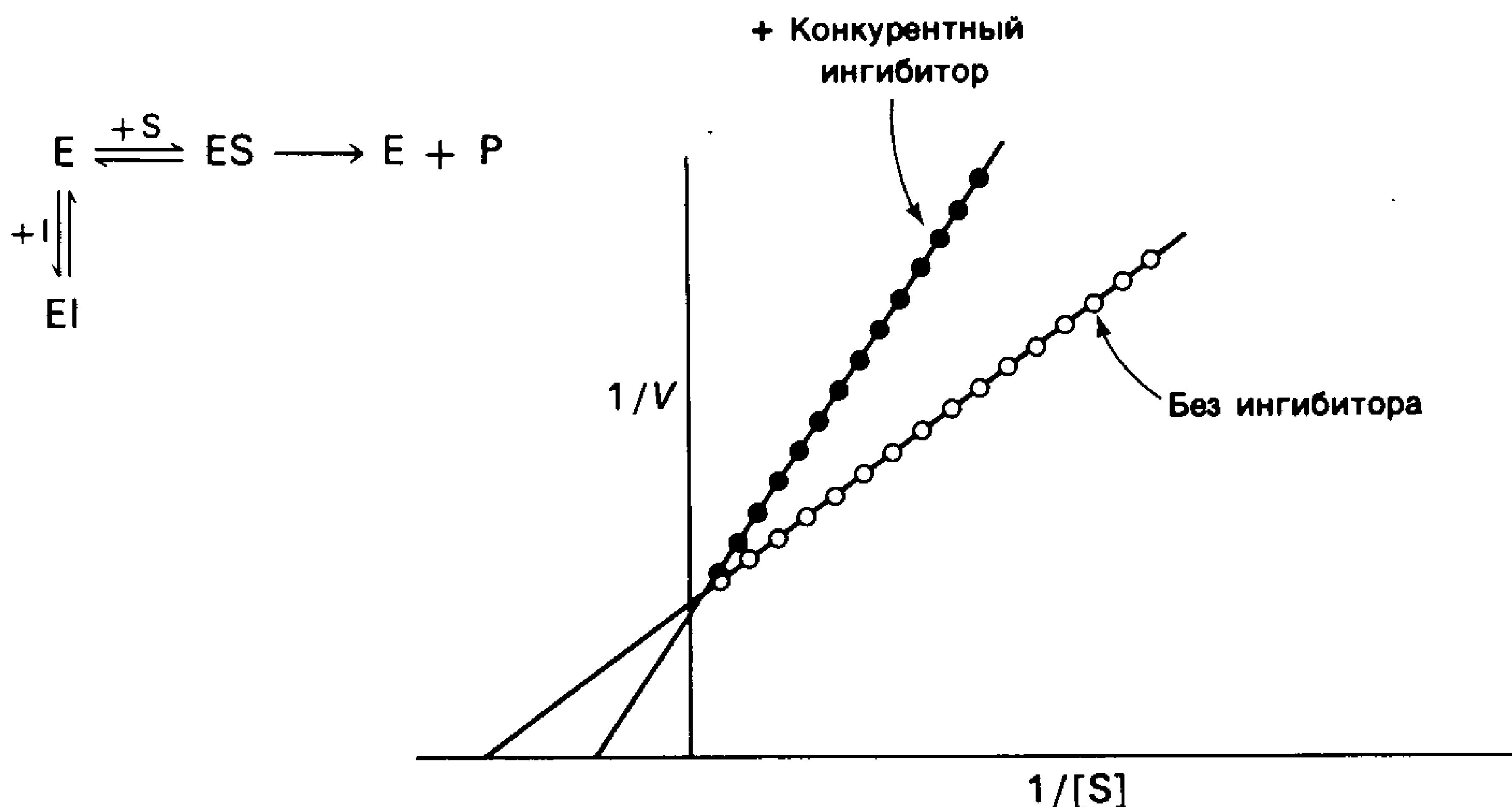


Рис. 6.17. Кинетика ферментативной реакции на графике двойных обратных величин в присутствии (●—●) или в отсутствие (○—○) конкурентного ингибитора. V_{max} не меняется, K_M возрастает.

гибитора, связывающегося с ферментом с $K_i = 10^{-3}$ М, кажущаяся K_M составит $3 \cdot 10^{-4}$ М. Отсюда $V = V_{max}/4$.

При *неконкурентном ингибировании* (рис. 6.18) V_{max} уменьшается, а это значит, что пересечение прямой с осью ординат произойдет в более высокой точке. В той же мере возрастает и наклон прямой, равный K_M / V^I_{max}. В отличие от V_{max} K_M не изменяется при этом виде ингибирования. *Повышение концентрации субстрата не снимает неконкурентного ингибирования.* Максимальная скорость реакции V^I_{max} в присутствии неконкурентного ингибитора задается уравнением

$$V^I_{max} = \frac{V_{max}}{1 + [I]/K_i}. \qquad (26)$$

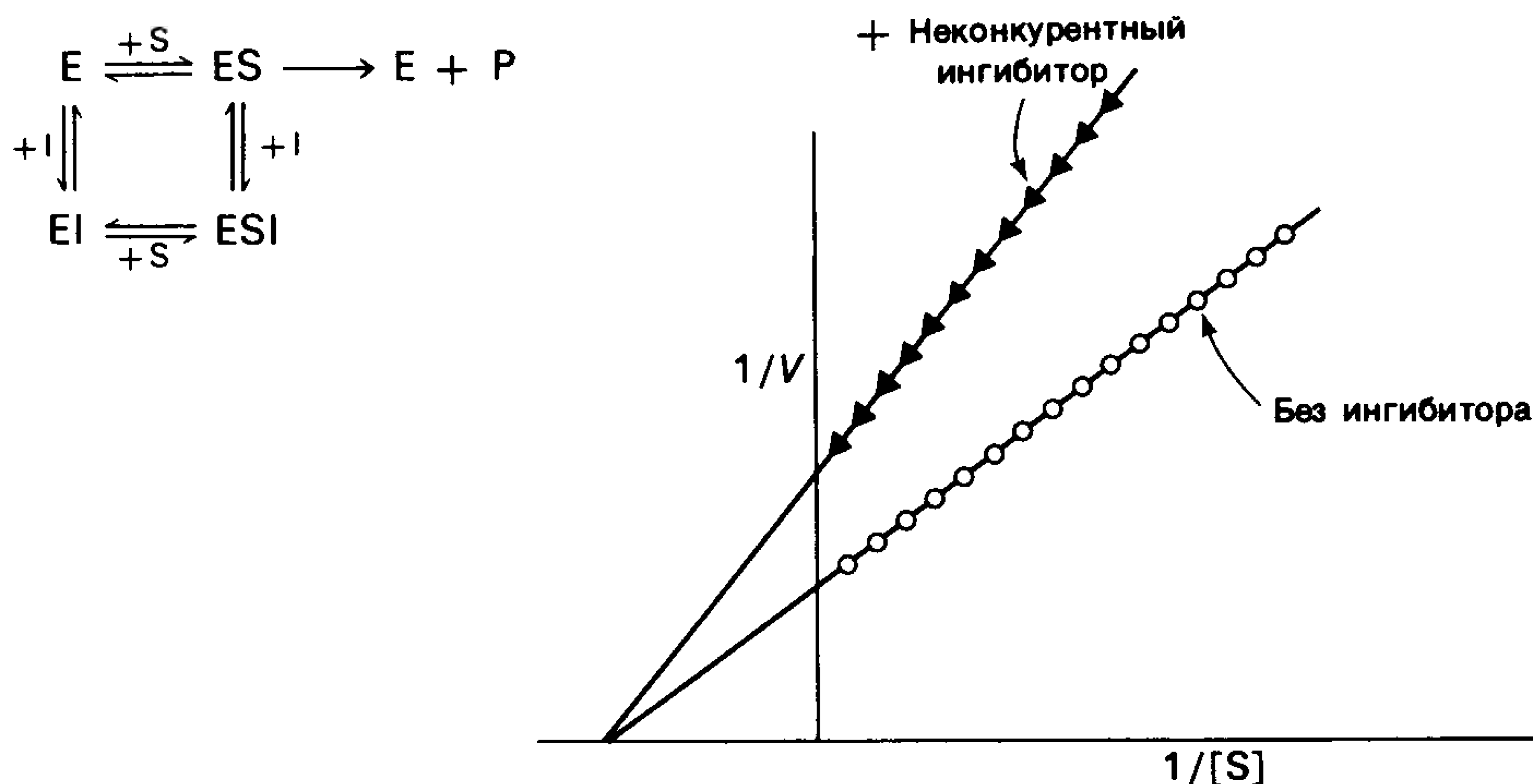


Рис. 6.18. Кинетика ферментативной реакции на графике двойных обратных величин в присутствии (▼—▼) или в отсутствие (○—○) неконкурентного ингибитора. Неконкурентный ингибитор не влияет на K_M, но снижает V_{max}.

6.15. Лечение отравления этиленгликолем на основе конкурентного ингибирования

Ежегодно около 50 человек погибают от отравления этиленгликолем – добавки в антифриз для автомобильных двигателей. Сам

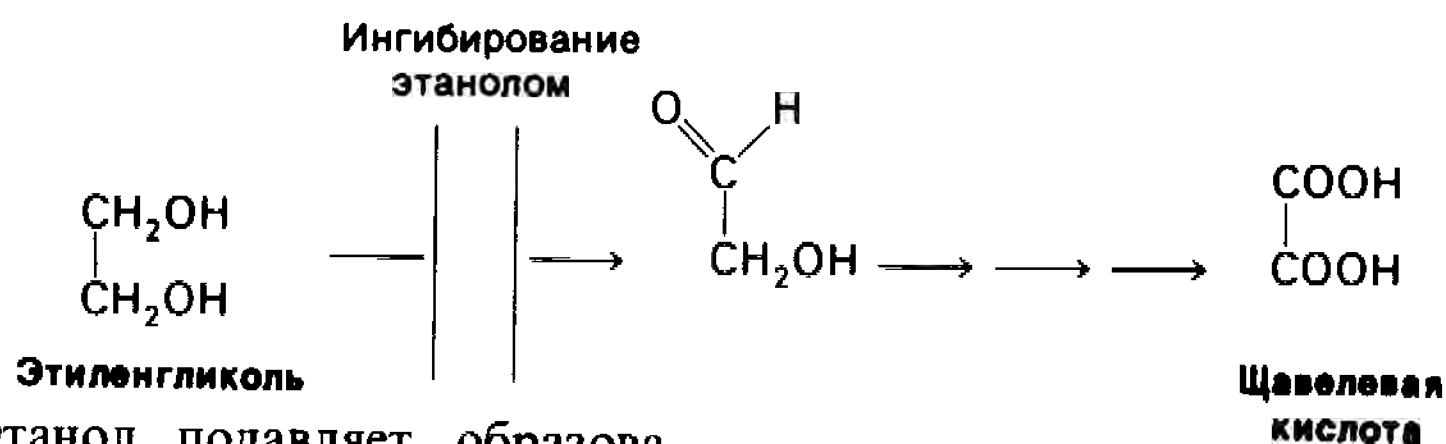


Рис. 6.19. Этанол подавляет образование щавелевой кислоты из этиленгликоля.

по себе этиленгликоль не обладает летальной токсичностью. Собственно ядом является продукт его окисления – щавелевая кислота. Первый этап превращения – окисление этиленгликоля алкогольдегидрогеназой (рис. 6.19). Эту реакцию можно эффективно затормозить путем введения большой, почти токсичной дозы этанола. Механизм действия состоит в том, что *этанол оказывается конкурентным субстратом и потому блокирует окисление этиленгликоля в альдегидные производные.* Этиленгликоль при этом выводится, не причиняя вреда. Такой же принцип лежит в основе лечения метанольного отравления.

6.16. Аллостерические ферменты не подчиняются кинетике Михаэлиса – Ментен

Модель Михаэлиса – Ментен оказала большое влияние на развитие энзимологии. Достоинство этой модели – в простоте и широкой применимости. Все же не все ферменты подчиняются кинетике Михаэлиса – Ментен. В первую очередь – это большая группа *аллостерических ферментов*, для которых зависимость скорости реакции V от концентрации субстрата [S] имеет сигмоидную форму, а не гиперболическую, как предсказывает уравнение Михаэлиса – Ментен [уравнение (15)]. Вспомним, что кривая связывания кислорода для миоглобина – гиперболическая, тогда как для гемоглобина – сигмоидная. Ситуация с ферментами совершенно аналогична. В аллостерических ферментах один активный центр в молекуле фермента оказывает влияние на другой активный центр в той же молекуле. В результате такого взаимодействия между субъединицами связывание субстрата становится кооперативным, и кривая зависимости V от [S] приобретает сигмоидную форму. Кроме того, активность аллостерических ферментов может регулироваться воздействием определенных молекул, связывающихся с ферментом в некаталитических участках, подобно тому, как на связывание кислорода гемоглобином влияют бисфосфоглицерат, H^+ и CO_2.

6.17. Согласованный механизм аллостерических взаимодействий

Изящную и четкую модель кинетики аллостерических ферментов предложили в 1965 г. Жак Моно, Джефри Уайман и Жан-Пьер Шанжё (J. Monod, J. Wyman, J.-P. Changeux). Используя их подход, рассмотрим аллостерический фермент, состоящий из двух идентичных субъединиц, каждая с одним активным центром. Допустим, что субъединицы могут находиться в двух конформациях – R и T. Конформация R (relaxed – релаксированная) обладает высоким сродством к субстрату, тогда как конформация T (tense – напряженная) – низким сродством (рис. 6.20). Вспомним, что так же обозначались две формы четвертичной структуры гемоглобина (разд. 4.10). Формы R и T могут переходить одна в другую. *В данной модели делается важное допущение, что для сохранения симметрии димера обе субъединицы должны находиться в одном и том же конформационном состоянии.* Таким образом разрешены состояния RR и TT и не разрешено состояние RT. Символами R_0 и T_0 обозначают разрешенные состояния в отсутствие субстрата и L – соотношение их концентраций:

$$R_0 \rightleftarrows T_0, \quad (27)$$

$$L = T_0/R_0. \quad (28)$$

Чтоб упростить рассуждения, допустим, что субстрат не присоединяется к T-форме фермента. В R-форме димер может связать одну или две молекулы субстрата; эти состоя-

ния обозначают соответственно R_1 и R_2:

$$R_0 + S \rightleftarrows R_1, \quad (29)$$

$$R_1 + S \rightleftarrows R_2, \quad (30)$$

$$K_R = \frac{2[R_0][S]}{[R_1]} = \frac{[R_1][S]}{2[R_2]}. \quad (31)$$

Согласно полученному уравнению, присоединение как первой, так и второй молекулы субстрата к R-форме димерного фермента имеет одну и ту же микроскопическую константу диссоциации K_R. Коэффициент 2 в уравнении (31) указывает на то, что субстрат может связаться с любым из двух активных центров на R_0 с образованием R_1, и аналогичным образом субстрат может высвободиться из любого из активных центров на R_2 с образованием R_1.

Выразим *степень насыщения* Y (т. е. долю активных центров, имеющих связанный субстрат) как функцию концентрации субстрата

$$Y = \frac{[\text{Связавшие субстрат центры}]}{[\text{Общее число центров}]} =$$

$$= \frac{[R_1] + 2[R_2]}{2([T_0] + [R_0] + [R_1] + [R_2])}. \quad (32)$$

Произведя замены в этом уравнении в соответствии с уравнениями (27) и (31), получаем искомое выражение для Y:

$$Y = \left(\frac{[S]}{K_R}\right) \frac{1 + [S]/K_R}{L + (1 + [S]/K_R)^2}. \quad (33)$$

Изобразим уравнение (33) графически, приняв $K_R = 10^{-5}$ М и $L = 10^4$. Зависимость Y от [S] выражается сигмоидной, а не гиперболической кривой (рис. 6.23). Другими словами, это уравнение соответствует *кооперативному связыванию субстрата*. Если число оборотов в расчете на один активный центр одинаково для фермент-субстратных комплексов с R_1 и R_2, то график зависимости скорости реакции от концентрации субстрата также будет сигмоидным, поскольку

$$V = YV_{max}. \quad (34)$$

Рассмотрим теперь этот процесс связывания (рис. 6.21). В отсутствие субстрата почти все молекулы фермента находятся в Т-форме. В приведенном выше примере на 10^4 молекул в Т-форме приходится только



Рис. 6.20. Схематическое изображение R- и Т-форм аллостерического фермента.

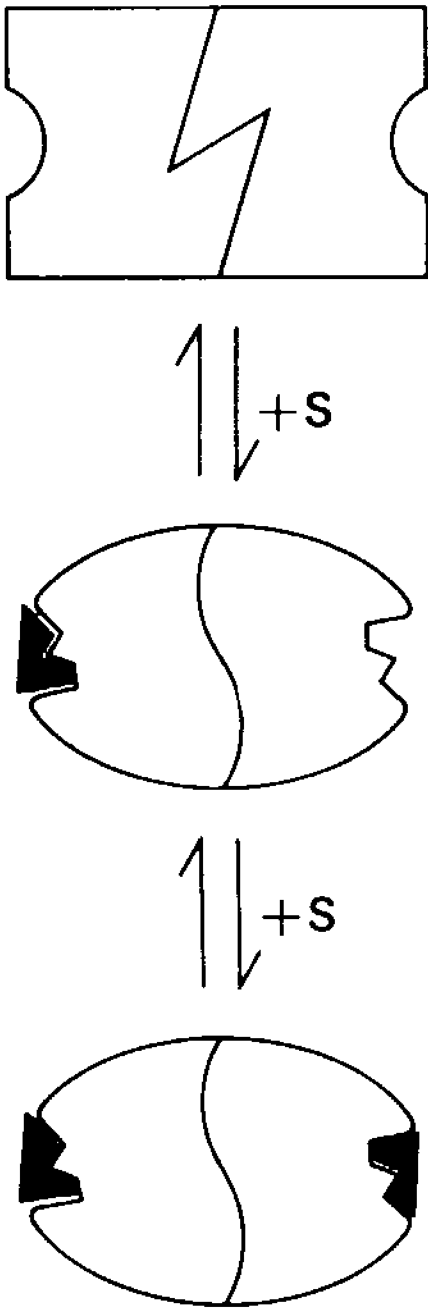


Рис. 6.21. *Модель согласованного механизма* кооперативного связывания субстрата аллостерическим ферментом. Присоединение первой молекулы субстрата сопровождается переходом ТТ-формы с низким сродством к субстрату в RR-форму с высоким сродством.

одна молекула в R-форме. Добавление субстрата сдвигает конформационное равновесие в сторону образования R-формы, поскольку именно R-форма связывает субстрат. Когда субстрат присоединяется к одному активному центру, второй активный центр должен быть также в R-форме, согласно основному постулату данной модели. Другими словами, переход от T к R и обратно все субъединицы фермента осуществляют *согласованно*. Следовательно, *по мере добавления субстрата доля молекул фермента в R-форме прогрессивно возрастает и связывание субстрата происходит кооперативно*. При полном насыщении активных центров все молекулы фермента оказываются в R-форме.

На основе модели согласованного механизма нетрудно объяснить влияние аллостерических ингибиторов и активаторов. Аллостерический ингибитор связывается преимущественно с T-формой, тогда как аллостерический активатор связывается преимущественно с R-формой (рис. 6.22). Следовательно, *аллостерический ингибитор сдвигает конформационное равновесие* $R \rightleftarrows T$ *в сторону T, а аллостерический активатор – в сторону R*. Эти эффекты можно выразить количественно через изменение константы аллостерического равновесия L, которая входит в виде переменной в уравнение (33). Аллостерический ингибитор повышает величину L, тогда как аллостерический активатор понижает ее. Эти влияния показаны на рис. 6.23, где Y отложено против [S] при следующих значениях L : 10^3 (в присутствии активатора), 10^4 (без активатора и без ингибитора), 10^5 (в присутствии ингибитора). Степень насыщения Y при всех значениях [S] снижается в присутствии ингибитора и повышается в присутствии активатора.

Здесь полезно остановиться еще на двух понятиях: это *гомотропные* эффекты, которые представляют собой аллостерические взаимодействия между идентичными лигандами (связанными молекулами или ионами), и *гетеротропные* эффекты, т. е. взаимодействия между различными лигандами. В рассмотренном выше примере кооперативное связывание субстрата ферментом представляло собой гомотропный эффект. В отличие от этого влияние активатора или ингибитора на связывание субстрата является

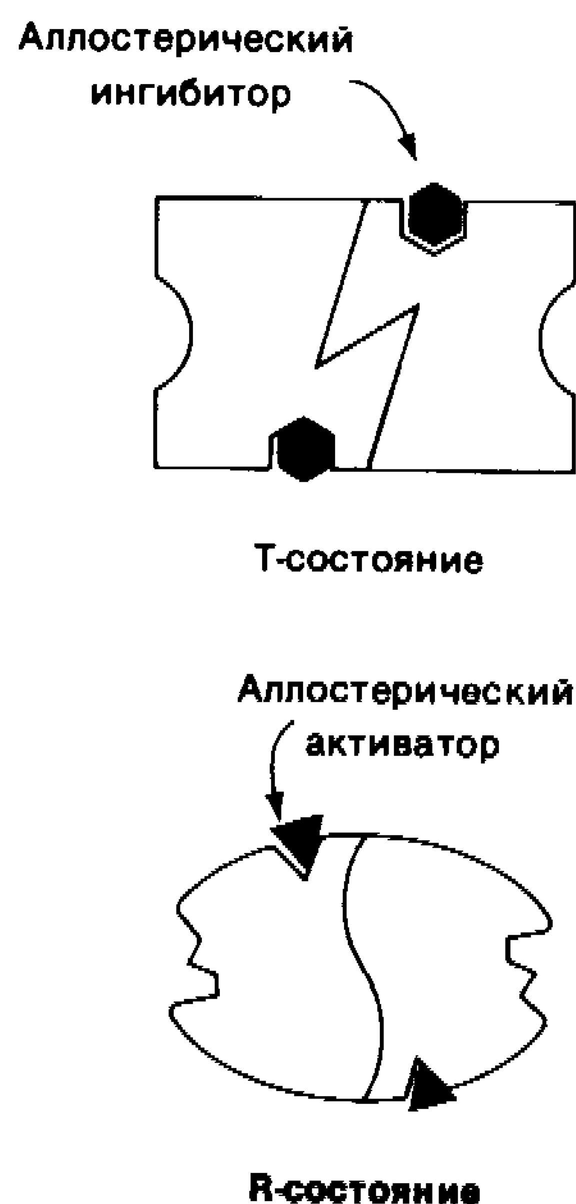


Рис. 6.22. В соответствии с моделью согласованного механизма аллостерический ингибитор (изображен в виде шестиугольника) стабилизирует форму T, тогда как аллостерический активатор (изображен в виде треугольника) стабилизирует форму R.

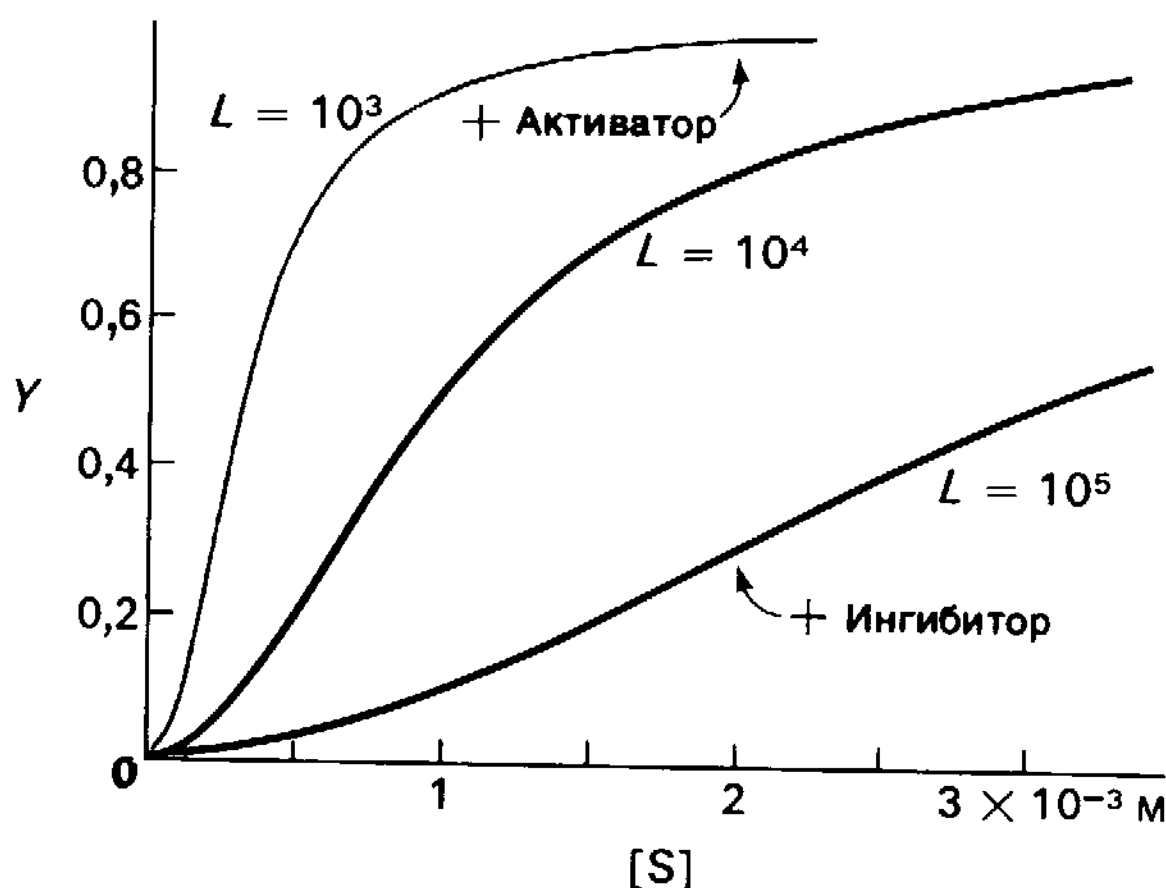


Рис. 6.23. Насыщение Y как функция концентрации субстрата [S] в соответствии с моделью согласованного механизма [уравнение (33)]. Показано также влияние аллостерического ингибитора и активатора.

гетеротропным, поскольку в этом случае взаимодействие происходит между молекулами разного типа. При согласованном механизме аллостерических взаимодействий гомотропные эффекты всегда положительны (кооперативны), а гетеротропные – либо положительны, либо отрицательны.

6.18. Последовательный механизм аллостерического взаимодействия

Аллостерические взаимодействия можно описать также с помощью *модели последовательного механизма*, разработанной Даниелем Кошландом (D. Koshland). В основу модели в простейшем случае положены три постулата.

1. Каждая субъединица может существовать в одном из двух возможных конформационных состояний (R или T).

2. Связывание субстрата изменяет форму той субъединицы, к которой он присоединяется. Конформация другой субъединицы при этом существенно не меняется.

3. Конформационные изменения, вызванные связыванием субстрата на одной субъединице, могут увеличивать или уменьшать сродство к субстрату другой субъединицы той же молекулы фермента.

Согласно модели последовательного механизма процесс связывания субстрата аллостерическим ферментом протекает так, как показано на рис. 6.24. Связывание является кооперативным, если у RT-формы сродство к субстрату выше, чем у TT-формы.

Модель простого последовательного механизма взаимодействия отличается от модели согласованного механизма в нескольких отношениях. Во-первых, модель последовательного механизма не предполагает равновесия между R- и T-формами в отсутствие субстрата. Напротив, присоединение субстрата *индуцирует* переход от T к R. Во-вторых, конформационный переход от T к R в разных субъединицах фермента происходит не согласованно, а последовательно. Гибридной форме RT отводится важная роль в модели последовательного механизма. В модели согласованного механизма наличие гибридной формы RT исключается. Эта модель исходит из важной роли симметрии во взаимодействии субъединиц в олигомерных белках и потому предполагает ее сохранение при аллостерических переходах. Модель же последовательного механизма, напротив, построена на предположении, что субъединицы могут взаимодействовать, да-

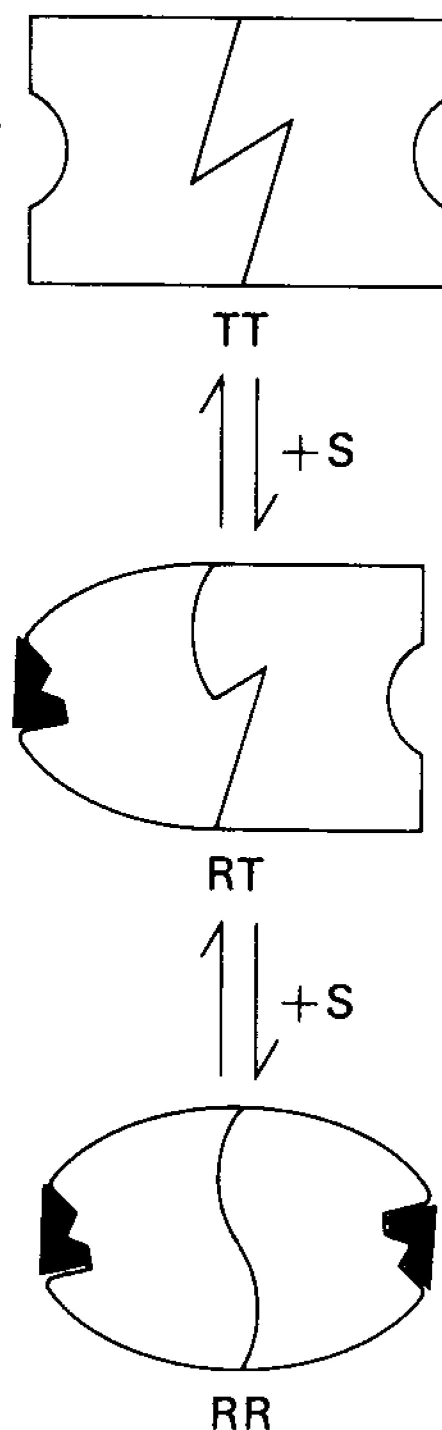


Рис. 6.24. *Модель последовательного механизма* кооперативного связывания субстрата аллостерическим ферментом. Свободный активный центр RT-формы обладает бо́льшим сродством к субстрату, чем активные центры TT-формы.

же если они находятся в разных конформационных формах. Наконец, различие заключается также и в том, что в случае согласованного механизма гомотропные взаимодействия всегда должны быть положительными, тогда как в случае последовательного механизма они могут быть либо положительными, либо отрицательными. Будет ли вторая молекула субстрата связываться с ферментом более или же менее прочно, чем первая, зависит от природы структурных переходов, вызванных присоединением первой молекулы субстрата.

Какая из моделей правильна? Для одних аллостерических белков хорошо подходит модель согласованного механизма, тогда как для других, по-видимому, применима модель последовательного механизма. Однако существует группа аллостерических

белков, к которым неприменимы обе модели. Предполагается, что эти белки имеют не два (R и T), а более конформационных состояния. Соответственно для описания аллостерических свойств таких белков требуются более сложные модели.

6.19. Водородные связи, а также электростатические и вандерваальсовы взаимодействия в фермент-субстратных комплексах

Обратимые молекулярные взаимодействия в биологических системах опосредуются силами трех типов. Складывание макромолекул в сложную структуру, связывание субстрата с ферментом, межклеточные взаимодействия, т. е. все молекулярные взаимодействия в биологических системах, осуществляются благодаря образованию *водородных связей, а также связей, обусловленных электростатическими и вандерваальсовыми взаимодействиями.* Эти три основных типа нековалентных связей различаются по своей геометрии, энергии и специфичности. Более того, хотя на них всегда сильно влияет присутствие воды, однако этот эффект проявляется по-разному. Рассмотрим подробнее каждый из этих основных типов связей.

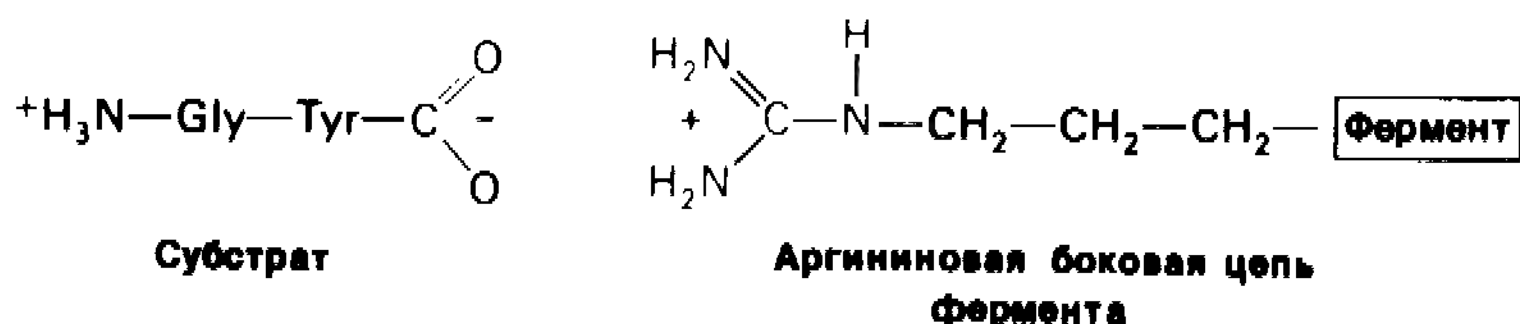
6.20. Заряженные субстраты могут связываться с противоположно заряженными группами фермента

Заряженная группа субстрата может реагировать с группой фермента, несущей противоположный заряд. Сила такого *электростатического взаимодействия* определяется законом Кулона:

$$F = \frac{q_1 q_2}{r^2 D},$$

где q_1 и q_2 – заряды соответствующих групп, r – расстояние между ними, D – диэлектрическая постоянная среды. Электростатическое взаимодействие наиболее сильно проявляется в вакууме (где $D = 1$) и наиболее слабо – в такой среде, как вода (где $D = 80$).

Примером электростатического взаимодействия может служить связывание глицил-L-тирозина с карбоксипептидазой A – протеолитическим ферментом, который отщепляет C-концевые остатки аминокислот. Отрицательно заряженная концевая карбоксильная группа дипептидного субстрата взаимодействует с положительно заряженной гуанидиниевой группой аргининового остатка на ферменте. Расстояние между этими двумя противоположно заряженными группами составляет 2,8 Å:

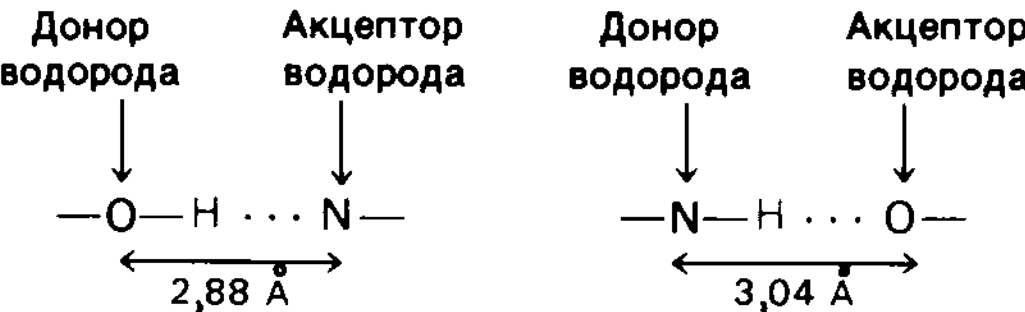


Такой тип взаимодействия называют также ионной связью, солевой связью, солевым мостиком или ионной парой. Все эти термины имеют одно и то же значение: электростатическое взаимодействие между противоположно заряженными группами. Между отрицательно заряженным субстратом и положительно заряженной боковой цепью лизинового или аргининового остатка могут возникать электростатические взаимодействия. Если величины pK имидазольной группы остатка гистидина или концевой аминогруппы полипептидной цепи обеспечивают их положительный заряд при данном pH среды, то они также могут функционировать как потенциальные участки связывания отрицательно заряженного субстрата. В случае если субстрат имеет положительный заряд, потенциальными участками связывания служат отрицательно заряженные карбоксильные группы аспартата и глутамата, а также концевая карбоксильная группа полипептидной цепи.

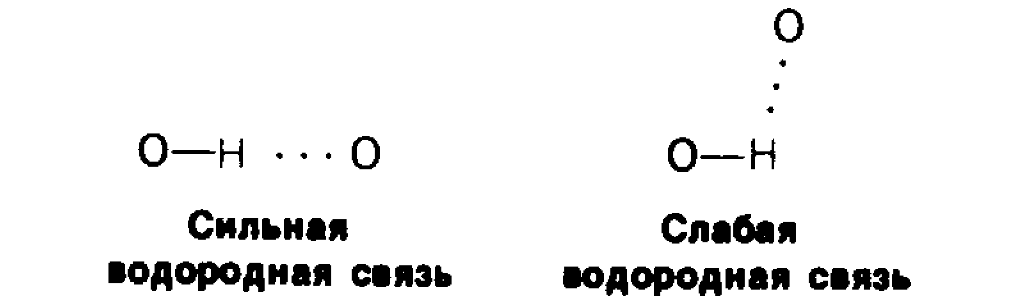
6.21. При связывании субстратов с ферментами образуются строго ориентированные водородные связи

Несмотря на то что многие субстраты не имеют заряда, они связываются с ферментами с высокой степенью специфичности и сродства. Основной вид взаимодействия таких субстратов, а также большинства заряженных субстратов с ферментами – это образование водородных связей. *В водородной связи атом водорода связан сразу с двумя другими атомами.* Тот атом, с которым водород связан более прочно, называют донором водорода, тогда как второй

атом-акцептором водорода. По существу водородную связь можно рассматривать как промежуточное взаимодействие, возникающее при переносе протона от кислоты к основанию. Атом-акцептор должен иметь частичный отрицательный заряд, который и притягивает водород. Короче говоря, водородная связь чем-то напоминает любовь втроем:

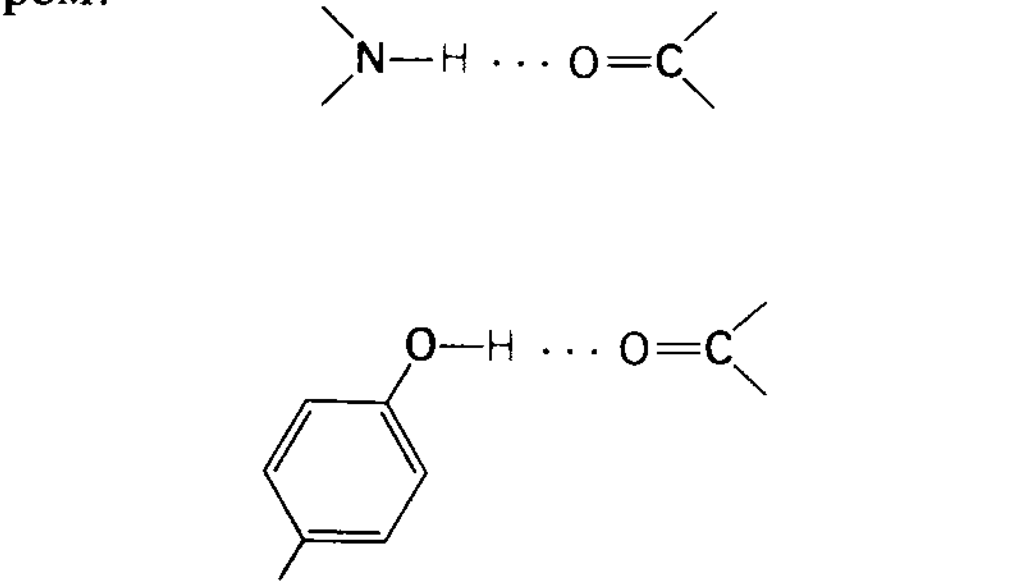


При образовании водородных связей в биологических системах атомами-донорами служат атомы азота или кислорода, ковалентно связанные с атомом водорода. Роль атомов-акцепторов выполняют кислород или азот. Типы водородных связей и их длины приведены в табл. 6.3. Энергия связей колеблется от примерно 3 до 7 ккал/моль. Водородные связи прочнее, чем связи, обусловленные вандерваальсовыми взаимодействиями, но значительно слабее, чем ковалентные связи. По длине водородные связи занимают промежуточное положение между ковалентными связями и связями, обусловленными вандерваальсовыми взаимодействиями. *Важная особенность водородных связей состоит в том, что их энергия зависит от геометрии.* Водородная связь оказывается наиболее сильной, если донор, водород и акцептор лежат на одной прямой. Если же атом-акцептор расположен под углом по отношению к линии, соединяющей атом-донор и водород, то связь будет тем слабее, чем больше этот угол:



Мы уже упоминали о водородных связях при обсуждении структуры миоглобина и гемоглобина. В α-спирали водородная связь соединяет друг с другом —NH- и —CO-группы пептидной цепи. При этом атом азота служит донором водорода, а атом кислорода – акцептором. Расстояние между атомами азота и кислорода составляет 2,9 Å; атом водорода находится ближе к азоту, чем к кислороду, на 0,9 Å.

Другой пример водородной связи в миоглобине и гемоглобине – связь между гидроксильной группой тирозина HC2 и пептидным карбонилом FG4. Атом кислорода в гидроксильной группе тирозина является донором водорода, а атом кислорода в пептидной C=O-группе – акцептором:



Роль водородных связей во взаимодействии субстрата с ферментом хорошо видна на примере связывания уридинсодержащей части субстрата с панкреатической рибонуклеазой – ферментом, расщепляющим рибонуклеиновую кислоту (рис. 6.25). В этом случае образуются три водородные связи.

1. Одна из C=O-групп уридинового кольца соединена водородной связью с N—H-группой пептидной цепи.

2. N—H-группа уридинового кольца соединена водородной связью с —OH-группой остатка треонина.

3. Другая C=O-группа уридинового кольца соединена водородной связью с —OH-группой остатка серина.

6.22. Белки обладают выраженной способностью к образованию водородных связей

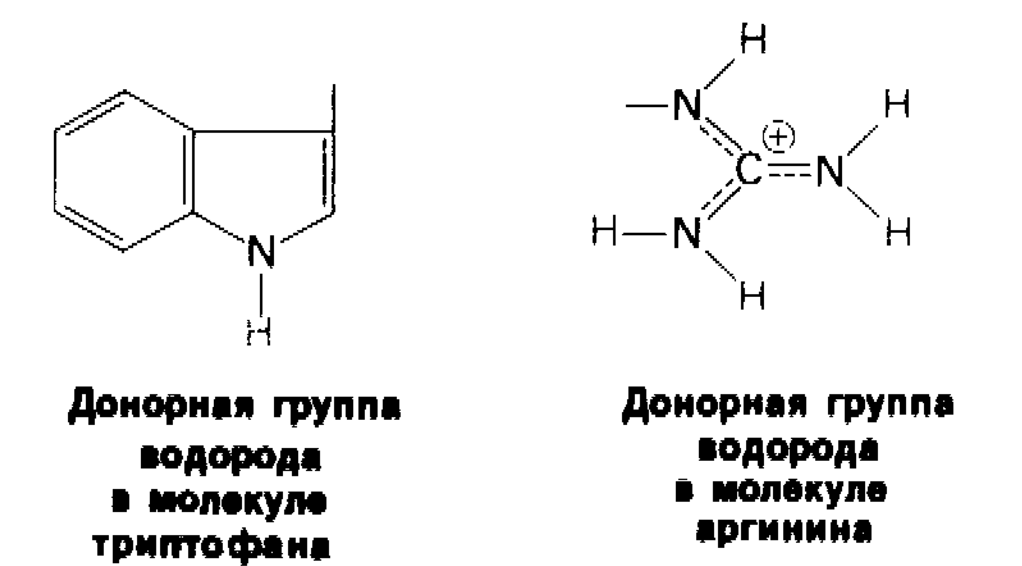
Боковые цепи аминокислот и основная пептидная цепь могут давать большое число

Таблица 6.3. **Типичные размеры водородных связей**

Связь	Длина, Å
O—H...O	2,70
O—H...O⁻	2,63
O—H...N	2,88
N—H...O	3,04
N^+—H...O	2,93
N—H...N	3,10

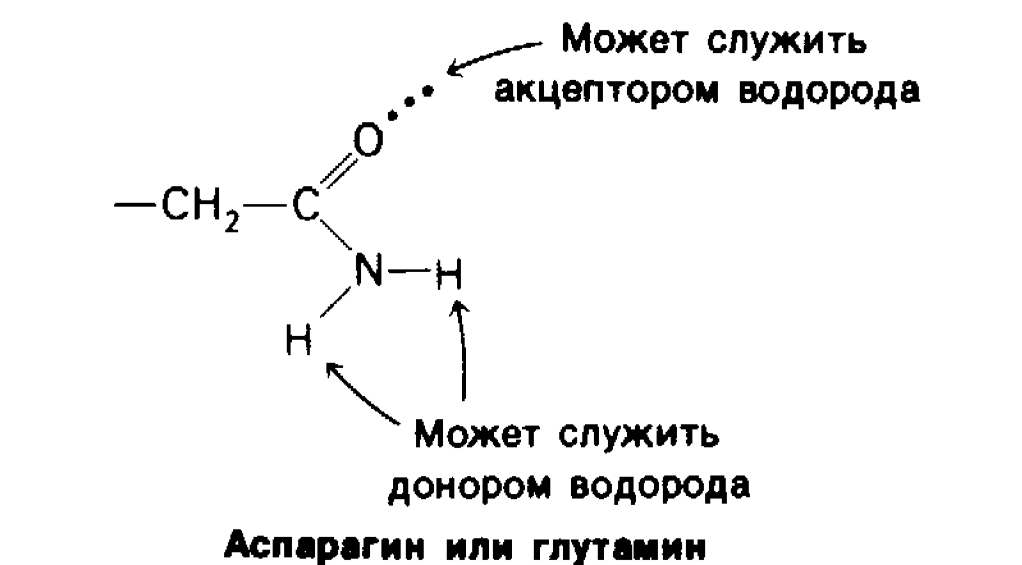
различных водородных связей. Так, из 20 встречающихся в белках аминокислот у 11 боковые цепи способны участвовать в образовании водородных связей. Удобно распределить эти аминокислоты на группы в зависимости от образуемых ими типов водородных связей.

1. Боковые цепи триптофана и аргинина могут служить *только донорами водорода:*



2. Боковые группы аспарагина, глутамина, серина и треонина могут служить *как донорами, так и акцепторами водорода,* и в этом отношении они подобны пептидной группе.

3. Способность образовывать водородные связи у лизина (и вообще у соединений с концевыми аминогруппами), у аспарагиновой и глутаминовой кислот (и у других соединений с концевыми карбоксильными группами), а также у пиридина и гистидина зависит от pH. В определенных границах pH они могут служить одновременно и донорами, и акцепторами водорода, тогда как при других значениях pH – либо донорами, либо акцепторами, как это показано для аспартата и глутамата на рис. 6.26. Иными словами, *образуемый этими ионизирующимися остатками тип водородной связи зависит от pH.*



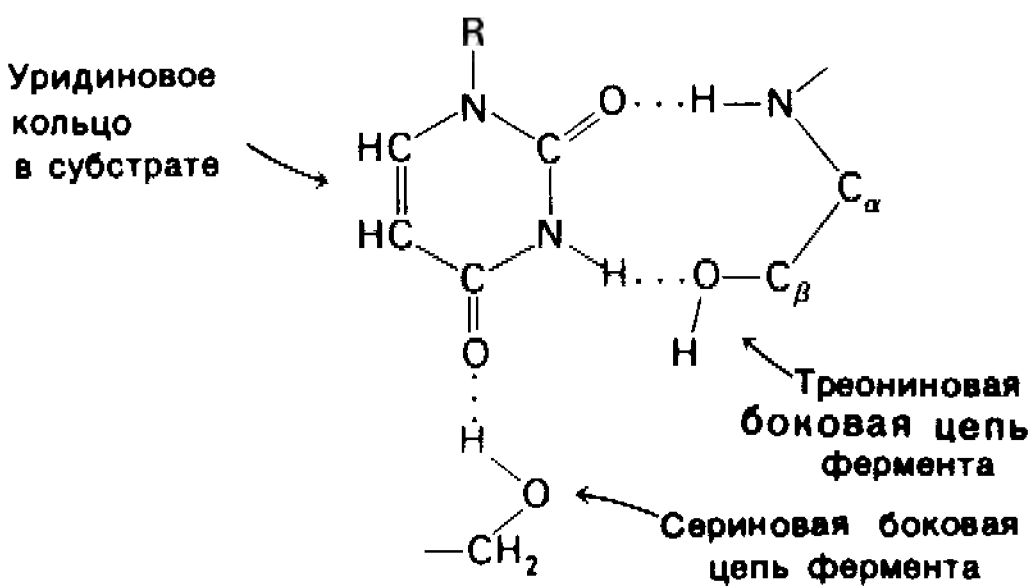


Рис. 6.25. Образование водородных связей при связывании субстрата рибонуклеазой. (Richards F. M., Wyckoff H. W., Allewell N., The Neurosciences: Second Study Program, F. O. Schmit, ed., Rockefeller University Press, 1970, p. 970.)

6.23. Вандерваальсовы взаимодействия играют важную роль в случаях стерической комплементарности

Если два каких-либо атома находятся на расстоянии 3–4 Å друг от друга, то между ними возникает неспецифическое притяжение. Такое притяжение, называемое вандерваальсовым взаимодействием, менее специфично и значительно слабее, чем электростатические взаимодействия или водородные связи, однако оно имеет не менее важное значение в биологических системах. В основе возникновения вандерваальсовых взаимодействий лежит тот факт, что распределение электронного заряда вокруг атома меняется во времени. В любой взятый момент времени распределение заряда не является полностью симметричным. Эта преходящая асимметрия электронного заряда одного атома вызывает изменение распределения электронов вокруг соседних атомов. По мере сближения двух атомов до так называемого *расстояния вандерваальсова контакта* сила притяжения между ними возрастает (рис. 6.27). На расстоянии, более коротком, чем контактное, начинают преобладать очень большие силы отталкивания, поскольку происходит перекрывание двух внешних электронных облаков. Контактное расстояние между атомами кислорода и углерода, например, составляет 3,4 Å, т. е. сумму контактных радиусов атома O (1,4 Å) и C (2,0 Å).

Энергия связи двух атомов, обусловленной вандерваальсовыми взаимодействиями, составляет около 1 ккал/моль. Это значи-

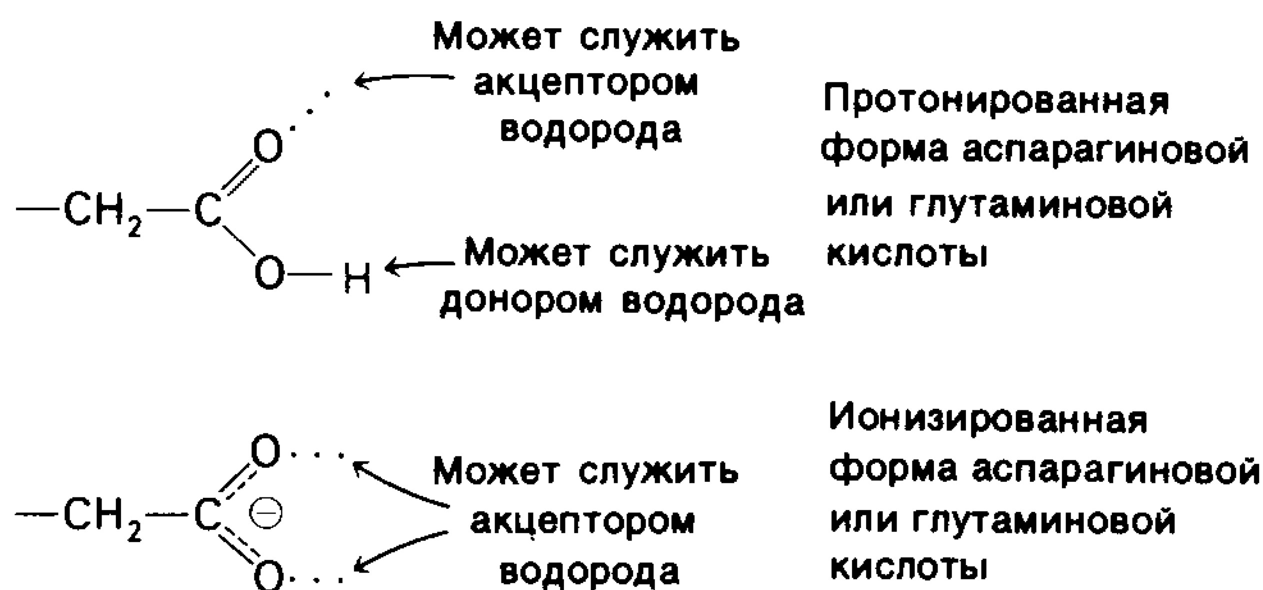


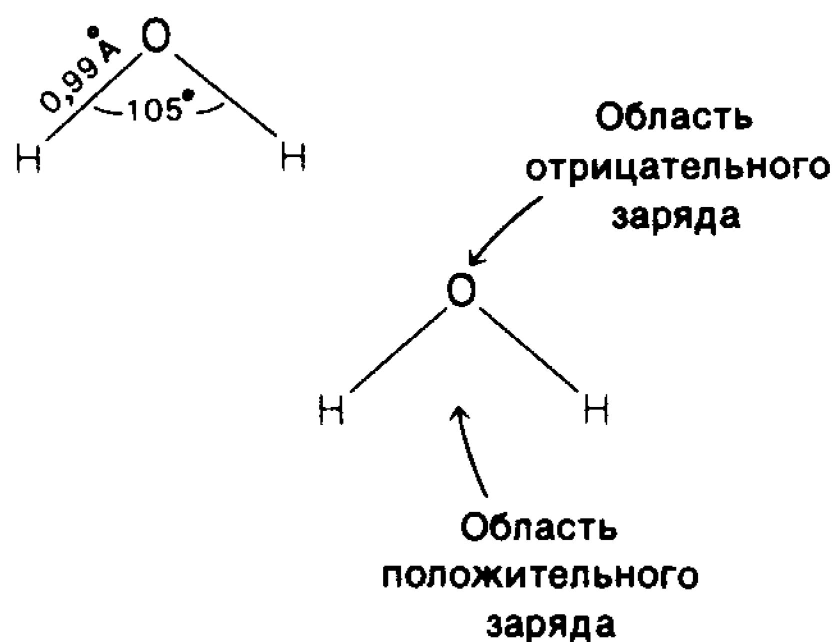
Рис. 6.26. Способность аспартата и глутамата к образованию водородных связей.

тельно меньше энергии водородных связей, а также связи, возникающей под влиянием электростатических сил, которая составляет 3–7 ккал/моль. Таким образом, одно отдельно взятое вандерваальсово взаимодействие имеет очень небольшое значение: сила возникающей связи едва превышает среднюю тепловую энергию молекул при комнатной температуре (0,6 ккал/моль). Вандерваальсовы взаимодействия приобретают большое значение только при одновременном сближении множества атомов субстрата с множеством атомов фермента. Вандерваальсово взаимодействие между двумя атомами резко уменьшается, если расстояние между ними превышает контактное всего лишь на 1 Å. Поэтому одновременное взаимодействие многочисленных атомов субстрата со множеством атомов фермента возможно только при условии совпадения форм субстрата и фермента. Другими словами, эффективное вандерваальсово взаимодействие между субстратом и ферментом возможно лишь при наличии *стерической комплементарности*. Следовательно, хотя каждое отдельно взятое вандерваальсово взаимодействие неспецифично, ***специфичность возникает при одновременном образовании большого числа вандерваальсовых связей***. Нужно отметить, что отталкивание, возникающее при сближении двух атомов на расстояние меньше вандерваальсова контактного, столь же необходимо для создания специфичности взаимодействия, как и притяжение.

6.24. Биологически важные свойства воды: полярность воды и ее способность к когезии

До сих пор мы не касались вопроса о том, как влияет вода на три основных типа связей, которые мы только что рассмотрели. На самом деле вода – активный участник молекулярных взаимодействий в биологических системах. В этом отношении два ее свойства имеют совершенно особое значение.

1. *Молекулы воды полярны.* Они имеют не линейную, а треугольную форму, вследствие чего распределение заряда оказывается асимметричным. Ядро атома кислорода оттягивает электроны от атомов водорода, и вокруг последних возникает область с общим положительным зарядом. Если вокруг атома кислорода описать тетраэдр так, чтобы в двух его углах находились атомы водорода, то два других угла тетраэдра окажутся электроотрицательными. Таким образом, молекула воды представляет собой полярную структуру:



2. *Молекулы воды обладают высоким сродством друг к другу.* Группа молекул воды образует конгломерат, в котором область положительного заряда отдельной молекулы ориентируется относительно области с отрицательным зарядом одной из близлежащих молекул. Каждая из двух областей с отрицательным зарядом притягивает протон от соседней молекулы. В то же время их собственные протоны притягивают кислородный конец соседней молекулы. Таким образом, каждый атом кисло-

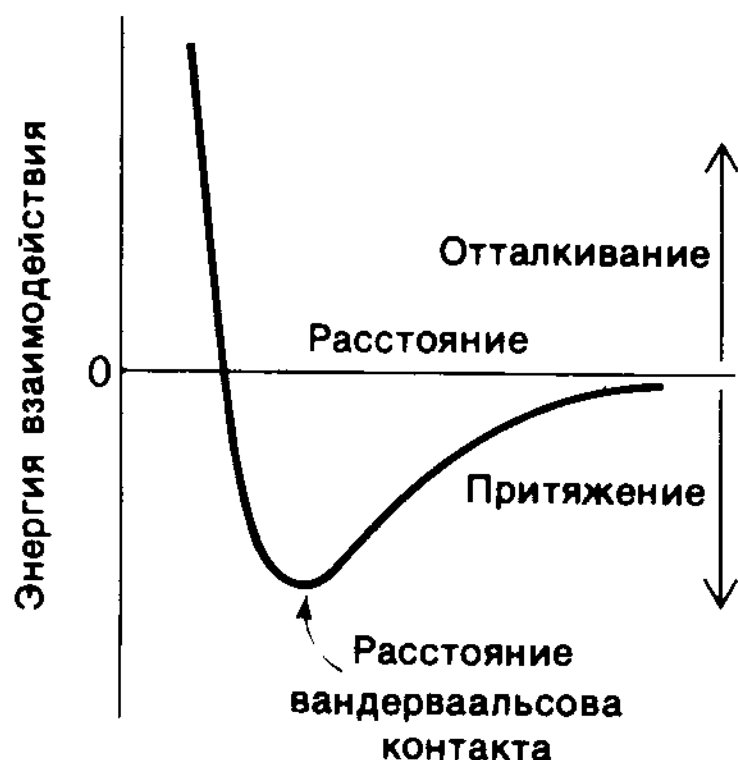


Рис. 6.27. Энергия связей, обусловленных вандерваальсовыми взаимодействиями, как функция расстояния между двумя атомами.

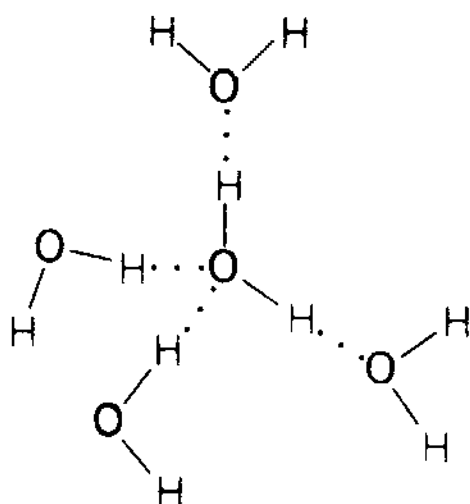
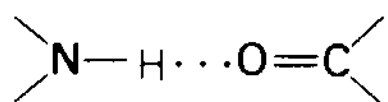
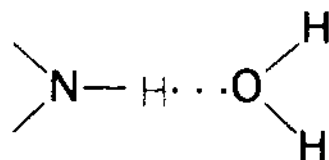
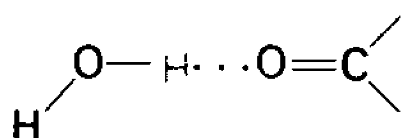


Рис. 6.28. Структура одной из форм льда.



В неполярной среде





В воде

Рис. 6.29. Вода ведет себя как конкурент при образовании водородных связей.

рода является центром тетраэдра, образованного другими кислородами, причем расстояние O—O составляет 2,76 Å.

На рис. 6.28 показана одна из структур льда. При таянии льда высокоупорядоченная структура его кристаллов разрывается во многих местах. Однако при этом разрушается лишь около 15% связей. В жидкой воде каждая молекула H_2O образует водородные связи в среднем с 3,4 соседних молекул. Таким образом, в жидком состоянии вода сохраняет частично упорядоченную структуру. Процесс образования и распада объединенных водородными связями агрегатов молекул воды идет беспрерывно. Самая удивительная особенность воды – это способность ее молекул *соединяться друг с другом*. И действительно, в воде число протонов и число свободных пар электронов, создающих соответственно положительные и отрицательные полюсы для образования водородных связей, всегда равны между собой. Расположение этих связей в виде тетраэдра приводит к образованию развитой трехмерной структуры. Таким образом, *вода обладает высокой когезионной силой*.

6.25. Присутствие воды ослабляет полярные взаимодействия

Полярность молекул и способность к образованию водородных связей делает воду высокоактивным соединением. Это проявляется в том, что вода ослабляет электростатические взаимодействия и водородные связи, возникающие между другими соединениями. При этих полярных взаимодействиях вода ведет себя как очень сильный конкурент. Рассмотрим, например, как действует вода на образование водородной связи между карбонильной и амидной группами (рис. 6.29). Водородные атомы воды способны заместить NH-группу в качестве донора, а кислородный атом воды – кислород CO-группы в качестве акцептора водорода. Следовательно, образование сильной водородной связи между CO- и NH-группами возможно только в отсутствие воды.

Сила электростатических взаимодействий в воде по сравнению с вакуумом снижена в 80 раз (80 – диэлектрическая постоянная воды). Высокая диэлектрическая постоянная воды отражает такие свойства, как полярность и способность образовывать вокруг ионов ориентированную сольватную оболочку, которая ослабляет электростатическое взаимодействие одного иона с другим

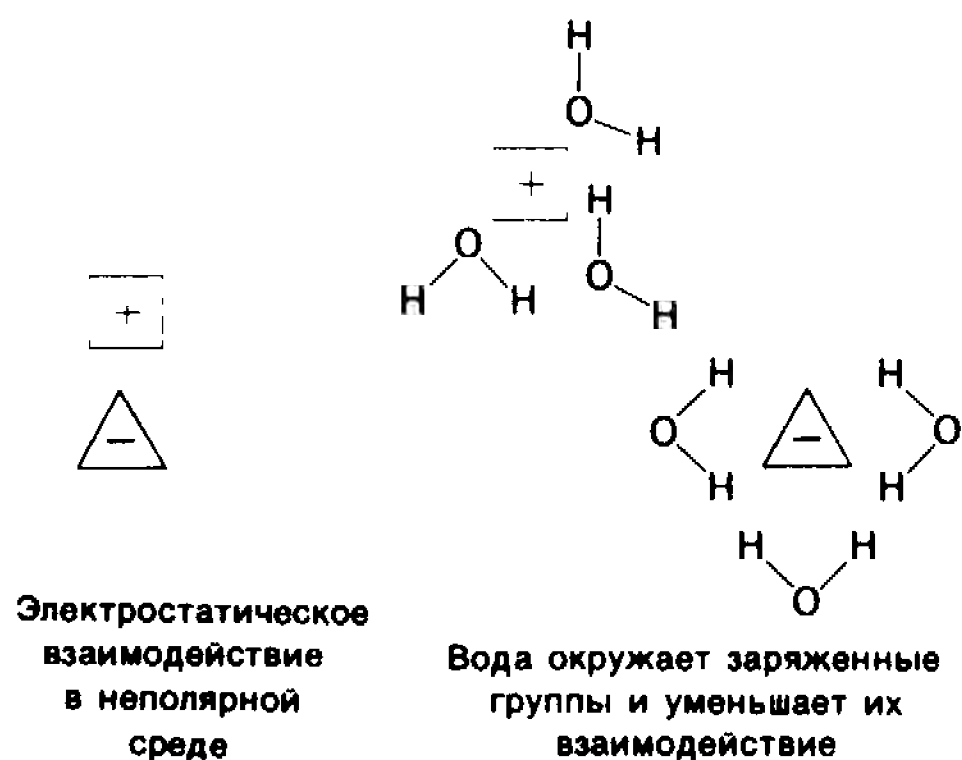


Рис. 6.30. Вода ослабляет электростатическое взаимодействие заряженных групп.

(рис. 6.30). Такие ориентированные сольватные оболочки создают собственное электрическое поле, противоположное по знаку полю, созданному ионом. В результате способность ионов, окруженных сольватными оболочками, к электростатическим взаимодействиям оказывается заметно ослабленной. Вода характеризуется исключительно высокой диэлектрической постоянной.

6.26. Гидрофобные взаимодействия: в водной среде неполярные группы стремятся ассоциировать

Каждый знает, как мелкие капельки масла в воде соединяются в одну большую каплю. Аналогичный процесс происходит и на уровне атомов, а именно *неполярные молекулы или группы в водной среде объединяются в кластеры*. Этот процесс ассоциации обусловлен *гидрофобными взаимодействиями*. Фигурально выражаясь, вода прижимает неполярные соединения друг к другу.

Гидрофобные взаимодействия играют решающую роль в складывании макромолекул, в связывании субстратов с ферментами и во многих других молекулярных процессах. Рассмотрим, что лежит в их основе. Допустим, что в воду вносится молекула неполярного соединения, например гексана. В воде при этом образуется полость, из-за чего на какой-то момент разрываются водородные связи между молекулами воды. Далее сдвинутые со своих мест молекулы воды переориентируются и образуют максимально возможное число новых водородных связей. Этого, однако, удается достичь лишь за определенную «плату»: возможностей образования благоприятных водородных связей в решетке воды вокруг молекул гексана значительно меньше, чем в чистой воде. В результате молекулы воды вокруг молекулы гексана располагаются гораздо более упорядоченным образом, чем в остальных частях раствора, а это означает, что энтропия раствора снижается. Посмотрим теперь, что произойдет, если в воде окажутся две молекулы гексана. Будут ли они находиться в двух малых полостях (рис. 6.31, *А*) или же в одной большой полости (рис. 6.31, *Б*)? Опыт показывает, что две молекулы гексана объединяются и занимают одну большую полость. Это объединение происходит в результате высвобождения отдельных ориентированных молекул воды, окружающих разделенные молекулы гексана. Следовательно, в основе гидрофобного взаимодействия лежит увеличение энтропии, обусловленное возрастанием степеней свободы высвобожденных молекул воды. Таким образом, *неполярные молекулы в воде объединяются друг с другом не в силу высокого взаимного сродства, а прежде всего вследствие существования прочных связей между молекулами воды.*

Заключение

Катализаторами в биологических системах служат ферменты; все ферменты – белки. Ферменты высокоспецифичны и обладают огромной каталитической силой. Обычно они повышают скорость реакции по крайней мере в 10^7 раз. Ферменты не сдвигают равновесия реакции, а выполняют функцию катализаторов путем снижения энергии активации химических реакций. Кинетические

Таблица 6.5. **Диэлектрические постоянные ряда растворителей**

Вещество	Диэлектрическая постоянная (20°С)
Гексан	1,9
Бензол	2,3
Диэтиловый эфир	4,3
Хлороформ	5,1
Ацетон	21,4
Этанол	24
Метанол	33
Вода	80
HCN	116

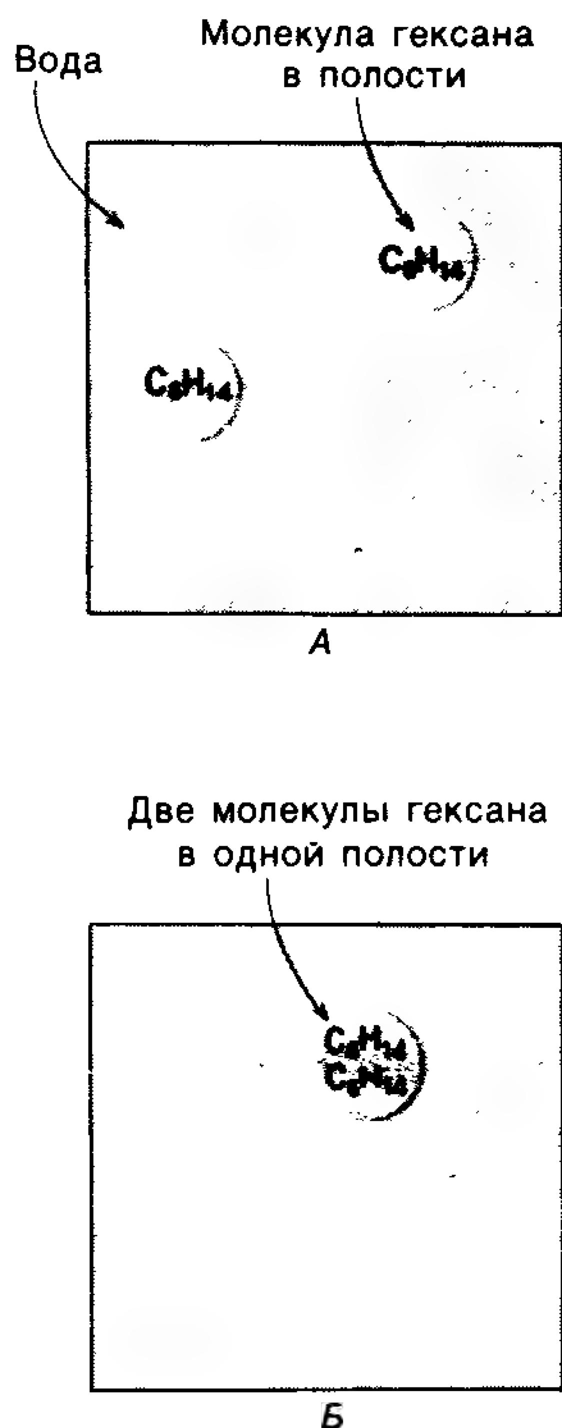
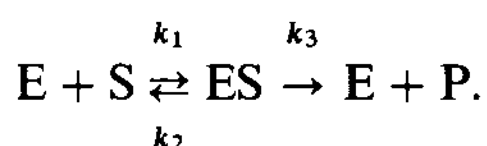


Рис. 6.31. Схематическое изображение двух молекул гексана в небольшом объеме воды. *А* – молекулы гексана занимают различные полости в структуре воды. *Б* – молекулы гексана занимают одну общую полость, что энергетически более выгодно.

параметры некоторых ферментов описываются моделью Михаэлиса – Ментен. Согласно этой модели, фермент (E) соединяется с субстратом (S), образуя фермент-субстратный комплекс (ES), который либо превращается далее в продукт (P) реакции, либо диссоциирует на E и S:



$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_3} E + P.$$

Скорость (V) образования продуктов описывается уравнением Михаэлиса – Ментен:

$$V = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M},$$

где V_{max} – скорость реакции при полном насыщении фермента субстратом, а K_M – константа Михаэлиса, равная концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину от максимальной. Максимальная скорость V_{max} равна произведению k_3 на общую концентрацию фермента. Кинетическая константа k_3, называемая числом оборотов фермента, показывает, сколько молекул субстрата превратилось в продукт реакции за единицу времени в одном каталитическом центре при полном насыщении фермента субстратом. Для большинства ферментов число оборотов лежит в пределах от 1 до 10^4 в 1 с.

Некоторые специфические низкомолекулярные вещества и ионы способны ингибировать ферменты. При необратимом ингибировании ингибитор ковалентно соединяется с ферментом или же связывается с ним настолько прочно, что его диссоциация идет очень медленно. В отличие от этого обратимое ингибирование характеризуется тем, что равновесие между ферментом и ингибитором устанавливается быстро. Конкурентный ингибитор препятствует связыванию субстрата в активном центре. Он уменьшает скорость реакции путем снижения относительного количества молекул фермента, связавших субстрат. При неконкурентном ингибировании ингибитор снижает число оборотов фермента. Конкурентное ингибирование в отличие от неконкурентного снимается при повышении концентрации субстрата; таким путем можно различить эти два вида ингибирования.

Каталитическая активность многих ферментов подвержена регуляции in vivo. В этом отношении особенно важную роль играют аллостерические взаимодействия, т. е. взаимодействия между пространственно разделенными участками фермента. Все известные в настоящее время аллостерические ферменты состоят из двух и более субъединиц. Аллостерические взаимодействия опосредованы конформационными изменениями, которые передаются с одной субъединицы на другую. Кривая зависимости скорости реакции V от концентрации субстрата [S] для аллостерических ферментов имеет сигмоидную, а не гиперболическую форму. Для объяснения некоторых свойств этих ферментов предложены две модели – модель согласованного механизма и модель последовательного механизма.

Обратимые молекулярные взаимодействия в биологических системах обусловлены возникновением водородных связей, а также электростатических и вандерваальсовых взаимодействий. Сильнейшее влияние на эти взаимодействия оказывает вода благодаря таким своим свойствам, как полярность, когезионная сила и способность к образованию водородных связей в качестве и донора, и акцептора водорода. В присутствии воды ослабевают электростатические взаимодействия и водородные связи между другими молекулами и ионами. С другой стороны, в присутствии воды усиливается взаимодействие неполярных молекул. Так, при связывании субстрата с активным центром, лежащим в щели на ферменте, происходит исключение воды из этой щели. Отсутствие воды усиливает электростатические взаимодействия и водородные связи между ферментом и субстратом. Ассоциация неполярных групп субстрата и активного центра фермента обеспечивает значительную часть энергии, необходимой для связывания. Основой специфичности фермент-субстратного взаимодействия служат, во-первых, водородные связи, имеющие резко выраженный направленный характер, и, во-вторых, форма активного центра фермента, которая препятствует связыванию некомплементарных ей молекул. Узнавание субстрата ферментами – это во многих случаях динамический процесс, сопровождающийся конформационными изменениями в активном центре фермента.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Koshland D. E., Jr., 1973. Protein shape and biological control, Sci. Amer., **229** (4), 52-64. (Прекрасно изложены основные представления о значении гибкости конформации для проявления специфичности и регуляции ферментативного действия.)

Книги по энзимологии

Fersht A., 1977. Enzyme Structure and Mechanism, Freeman. [Имеется перевод: Фёршт Э. Структура и механизм действия ферментов.– М.: Мир, 1980.] (Ясное и четкое изложение основных представлений о механизме ферментативного действия; особое внимание уделено физическим аспектам.)

Walsh C., 1979. Enzymatic Reaction Mechanisms, Freeman.
(Превосходное описание химических основ ферментативного действия. Авторы показывают, что огромное количество ферментативных реакций, протекающих в биологических системах, можно сгруппировать в несколько основных типов химических реакций.)

Boyer P. D. (ed.), 1970. The Enzymes (3rd ed.), Academic Press.
(Многотомный трактат по ферментам, содержащий обширную информацию. В томах 1 и 2 - изданных также и в бумажном переплете – приведены общие сведения о структуре ферментов, а также о механизме и регуляции ферментативной активности. В томе 3 и последующих томах помещены подробные статьи авторитетных ученых, посвященные отдельным ферментам.)

Кинетика и механизм ферментативных реакций

Fersht A. R., 1974. Catalysis, binding, and enzymesubstrate complementarity, Proc. Roy. Soc., B **187**, 397–407.

Jencks W. P., 1975. Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: the Circe effect, Advan. Enzymol., **43**, 219-410.

Knowles J. R., Albery W. J., 1976. Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency, Biochemistry, **15**, 5631–5640.

Warshel A., 1978. Energetics of enzyme catalysis, Proc. Nat. Acad. Sci., **75**, 5250-5254. (Рассматривается гипотеза, в которой подчеркивается важная роль электростатических взаимодействий.)

Аллостерические взаимодействия

Monod J., Changeux J.-P., Jacob F., 1963. Allosteric proteins and cellular control systems, J. Mol. Biol., **6**, 306–329. (Классическая работа, в которой изложена концепция об аллостерических взаимодействиях.)

Monod J., Wyman J., Changeux J.-P., 1965. On the nature of allosteric transition, J. Mol. Biol., **12**, 88–118. (Описание модели согласованного механизма аллостерических переходов.)

Koshland D. E., Jr., Nemethy G., Filmer D., 1966. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits, Biochemistry, **5**, 365–385. (Описание модели последовательного механизма аллостерических переходов.)

Молекулярные взаимодействия и связывание

Richards F. M., Wyckoff H. W., Allewell N., 1970. The origin of specificity in binding: a detailed example in a protein-nucleic acid interaction. In: Schmitt F. O. (ed.). The Neurosciences: Second Study Program, pp. 901-912, Rockefeller University Press.

Davidson N., 1967. Weak interactions and the structure of biological macromolecules. In: Quarton G. C., Melnechuk T. and Schmitt F. O. (eds.), The Neurosciences: A Study Program, pp. 46-56, Rockefeller University Press.

Tanford C., 1978. The hydrophobic effect and the organization of living matter, Science, **200**, 1012–1018.

Вопросы и задачи

1. В осуществлении биосинтетических реакций, например синтеза ДНК, важную роль играет гидролиз пирофосфата до ортофосфата. У *E. coli* этот гидролиз катализируется пирофосфатазой, имеющей мол. массу 120 кДа и состоящей из 6 идентичных субъединиц. V_{max} очищенной пирофосфатазы составляет 2800 ед. на 1 мг белка. За единицу активности данного фермента принято количество фермента, гидролизующее 10 мкмоль пирофосфата за 15 мин при 37°С в стандартных условиях определения.

а) Сколько молей субстрата в секунду гидролизует 1 мг фермента, если концентрация субстрата значительно выше K_M?

б) Сколько молей активных центров содержится в 1 мг фермента? Примем, что в каждой субъединице имеется по одному активному центру.

в) Каково число оборотов данного фермента? Сравните его с упомянутыми в этой главе числами оборота других ферментов.

2. Пенициллин гидролизуется и тем самым инактивируется пенициллиназой – ферментом, имеющимся у ряда резистентных бактерий. Молекулярная масса пенициллиназы из *Staphylococcus aureus* составляет 29,6 кДа. Измеряли количество пенициллина, гидролизуемого в 12 мл раствора в течение 1 мин в присутствии 10^{-9} г очищенной пенициллиназы как функцию концентрации пенициллина. Примем, что в ходе определения концентрация пенициллина практически не менялась.

[Пенициллин], М	Количество гидролизовавшегося пенициллина, моль
$0,1 \cdot 10^{-5}$	$0,11 \cdot 10^{-9}$
$0,3 \cdot 10^{-5}$	$0,25 \cdot 10^{-9}$
$0,5 \cdot 10^{-5}$	$0,34 \cdot 10^{-9}$
$1,0 \cdot 10^{-5}$	$0,45 \cdot 10^{-9}$
$3,0 \cdot 10^{-5}$	$0,58 \cdot 10^{-9}$
$5,0 \cdot 10^{-5}$	$0,61 \cdot 10^{-9}$

а) Постройте по этим данным график в координатах $1/V$ против $1/[S]$. Подчиняется ли пенициллиназа кинетике Михаэлиса – Ментен? Если да, то чему равна K_M?

б) Чему равна V_{max}?

в) Каково число оборотов пенициллиназы в этих экспериментальных условиях? Примем, что на одну молекулу фермента приходится один активный центр.

3. Измеряли кинетику ферментативной реакции в зависимости от концентрации субстрата в присутствии или в отсутствие ингибитора (I); были получены следующие данные:

[S], М	Скорость реакции, мкмоль/мин	
	без ингибитора	с ингибитором
$0,3 \cdot 10^{-5}$	10,4	4,1
$0,5 \cdot 10^{-5}$	14,5	6,4
$1,0 \cdot 10^{-5}$	22,5	11,3
$3,0 \cdot 10^{-5}$	33,8	22,6
$9,0 \cdot 10^{-5}$	40,5	33,8

а) Чему равны V_{max} и K_M в отсутствие ингибитора? В присутствии его?

б) Каков тип ингибирования?

в) Чему равна константа связывания ингибитора?

г) Если $[S] = 1 \cdot 10^{-5}$ М и $[I] = 2 \cdot 10^{-3}$ М, то какова доля молекул фермента, связавших субстрат? Связавших ингибитор?

д) Если $[S] = 3 \cdot 10^{-5}$ М, то какова доля молекул фермента, связавших субстрат в присутствии $2 \cdot 10^{-3}$ М ингибитора и в отсутствие его? Сравните соотношение полученных величин с соотношением скоростей реакции при тех же условиях.

4. Анализировали кинетику фермента, рассмотренного в задаче 3, в присутствии другого ингибитора, добавленного в концентрации 10^{-4} М:

[S], М	Скорость реакции, мкмоль/мин	
	без ингибитора	с ингибитором
$0,3 \cdot 10^{-5}$	10,4	2,1
$0,5 \cdot 10^{-5}$	14,5	2,9
$1,0 \cdot 10^{-5}$	22,5	4,5
$3,0 \cdot 10^{-5}$	33,8	6,8
$9,0 \cdot 10^{-5}$	40,5	8,1

а) Каковы значения V_{max} и K_M в присутствии ингибитора? Сравните их с величинами, полученными в задаче 3.

б) Каков тип ингибирования?

в) Какова константа диссоциации этого ингибитора?

г) При $[S] = 3 \cdot 10^{-5}$ М какая доля молекул фермента связана с субстратом в присутствии 10^{-4} М ингибитора? В отсутствие его?

5. График в координатах $1/V$ против $1/[S]$ называют графиком Лайнуивера – Бёрка. Кинетические данные можно изобразить также в координатах V против $V/[S]$, т.е. в координатах Эди – Хофсти.

а) Преобразуйте уравнение Михаэлиса – Ментен так, чтобы получить V как функцию $V/[S]$.

б) Каков физический смысл наклона кривой и точек ее пересечения с осью x и осью y на графике V против $V/[S]$?

в) Изобразите, как должна выглядеть зависимость V от $V/[S]$ в отсутствие ингибитора, в присутствии конкурентного ингибитора, в присутствии неконкурентного ингибитора?

6. В случае аллостерических ферментов ингибитор в низких концентрациях часто оказывает активирующее действие. Почему? (Подсказка: подумайте об аналогии с CO-гемоглобином.)

7. Гормон прогестерон содержит две кетонные группы. О свойствах рецепторного белка, узнающего прогестерон, известно очень мало. Боковые цепи каких аминокислот могли бы образовать водородные связи с прогестероном при pH 7? (Примем, что боковые цепи в белке-рецепторе имеют те же значения pK, что и в свободных аминокислотах, растворенных в воде.)

8. Допустим, что субстраты A и B конкурируют за фермент. Составьте выражение, связывающее соотношение скоростей использования A и B (V_A/V_B) с концентрацией этих субстратов и с величинами их k_3 и K_M. (Подсказка: выразите V_A как функцию k_3/K_M для субстрата A и затем сделайте то же для субстрата B.) Можно ли считать, что специфичность определяется только K_M?

Дополнительные вопросы см.: Wood W. B., Wilson J. H., Benhow R. M., Hood L. E., Biochemistry: A Problems Approach, Benjamin, 1974, гл. 6 и 7, а также Montgomery R., Swenson C. A., Quantitative Problems in the Biochemical Sciences, 2nd ed., Freeman, 1976, гл. 11.

ГЛАВА 7.
Механизм действия ферментов: лизоцим и карбоксипептидаза

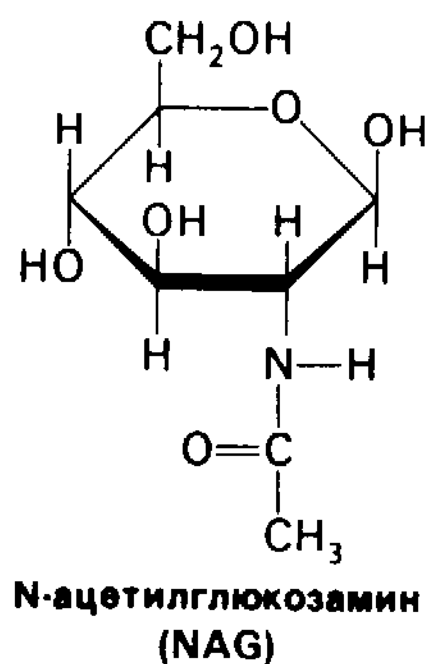
В 1922 г. лондонский бактериолог Александр Флеминг (A. Fleming) простудился. Он был не из тех, кто упускает случай, и быстро сообразил, что может использовать свое недомогание как возможность провести эксперимент. Поместив несколько капель носовой слизи на чашку, где выращивались бактерии, он через некоторое время с волнением обнаружил, что вокруг слизистых выделений бактерии растворились. Флеминг предположил, что в слизи, вероятно, содержится универсальный антибиотик, поиском которого он как раз занимался. Флеминг установил природу антибактериального вещества: это был фермент, который он назвал лизоцимом – *лизо*, потому что он растворял (лизировал) бактерии, *цим (зим)*, потому что он был ферментом (энзимом). Флеминг открыл, кроме того, новый вид бактерий, особенно чувствительных к действию лизоцима; эти мелкие округлые бактерии он назвал *Micrococcus lysodeikticus* ("deiktikos" – способный показывать). Флеминг обнаружил, что много лизоцима содержится в слезах. Слезы получали от добровольцев, которых подвергали «испытанию лимоном» – закапывали в глаз немножко лимонного сока. Тогда же в журнале «St. Marry's Hospital Gazette» была помещена карикатура, изображающая детишек, пришедших ради нескольких пенсов в лабораторию Флеминга, где один сотрудник их колотит, а второй собирает слезы! Флеминг был, однако, разочарован, когда обнаружил, что лизоцим не эффективен в отношении наиболее опасных микробов. Спустя 7 лет он все же открыл высокоэффективный антибиотик – пенициллин, поразительным образом подтвердив замечание Пастера, что случай является к тому, кто его ищет.

7.1. Лизоцим расщепляет клеточные стенки бактерий

Лизоцим растворяет клетки определенных видов бактерий, расщепляя полисахаридный компонент клеточных стенок. Функция клеточных стенок бактерий – обеспечение механической прочности. Бактерия, лишенная клеточной стенки, обычно лопается из-за высокого осмотического давления внутри клетки. Структуру клеточных стенок бакте-



Рис. 7.1. Электронная микрофотография изолированных клеточных стенок *Micrococcus lysodeiktikus*. (Печатается с любезного разрешения д-ра N. Sharon.)



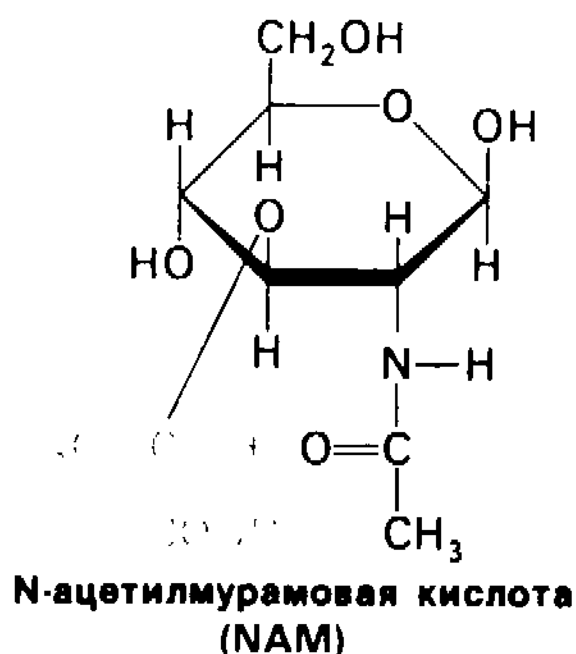


Рис. 7.2. Углеводные остатки в полисахариде клеточных стенок бактерий.

рий мы подробно рассмотрим в одной из следующих глав. Здесь же остановимся только на структуре их полисахаридного компонента.

Полисахарид клеточной стенки содержит два типа сахаров: *N-ацетилглюкозамин* (NAG) и *N-ацетилмурамовую кислоту* (NAM). Оба сахара являются производными глюкозамина с ацетилированной аминогруппой (рис. 7.2). В NAM углерод С-3 углеводного кольца образует эфирную связь с боковой цепью лактата. В клеточной стенке бактерий NAM и NAG соединены *гликозидной связью* между С-1 одного углеводного остатка и С-4 другого. Атом кислорода в гликозидной связи располагается либо выше, либо ниже плоскости, в которой лежат углеводные кольца: при α-конфигурации атом кислорода расположен ниже плоскости сахара, при β-конфигурации – над этой плоскостью (более подробно о свойствах и номенклатуре сахаров см. гл. 12). Все гликозидные связи в полисахаридах клеточных стенок имеют β-конфигурацию (рис. 7.3). NAM и NAG расположены поочередно. Итак, полисахарид клеточной стенки бактерий представляет собой полимер чередующихся остатков NAM и NAG, соединенных гликозидными связями β (1 → 4). Далее, отдельные цепи полисахаридов соединяются поперечными сшивками из коротких пептидов, прикрепляющихся к остаткам NAM.

Лизоцим гидролизует гликозидную связь между С-1 NAM и С-4 NAG (рис. 7.4). Другая гликозидная связь - между С-1 NAG и С-4 NAM – при этом не расщепляется. Субстратом лизоцима служит также *хитин* – полисахарид панциря ракообразных. Хитин состоит только из остатков NAG, соединенных между собой гликозидными связями β (1 → 4).

7.2. Трехмерная структура лизоцима

Лизоцим – относительно небольшой фермент. Лизоцим, выделенный из белка куриных яиц, где он содержится в большом количестве, представляет собой одну полипептидную цепь из 129 аминокислотных остатков и массой 14,6 кДа. В молекуле лизоцима имеется четыре поперечных дисульфидных мостика, обусловливающих стабильность фермента. Последовательность аминокислот в лизоциме показана на рис. 7.5.

В 1965 г. Дэвид Филлипс (D. Phillips) с сотрудниками определили трехмерную структуру лизоцима. Так впервые была получена карта высокого разрешения для белка, обладающего ферментативной активностью. Молекула лизоцима оказалась компактной, приближенно эллипсоидной формы размерами 45 × 30 × 30 Å. Как показано на рис. 7.7, укладка полипептидной цепи носит

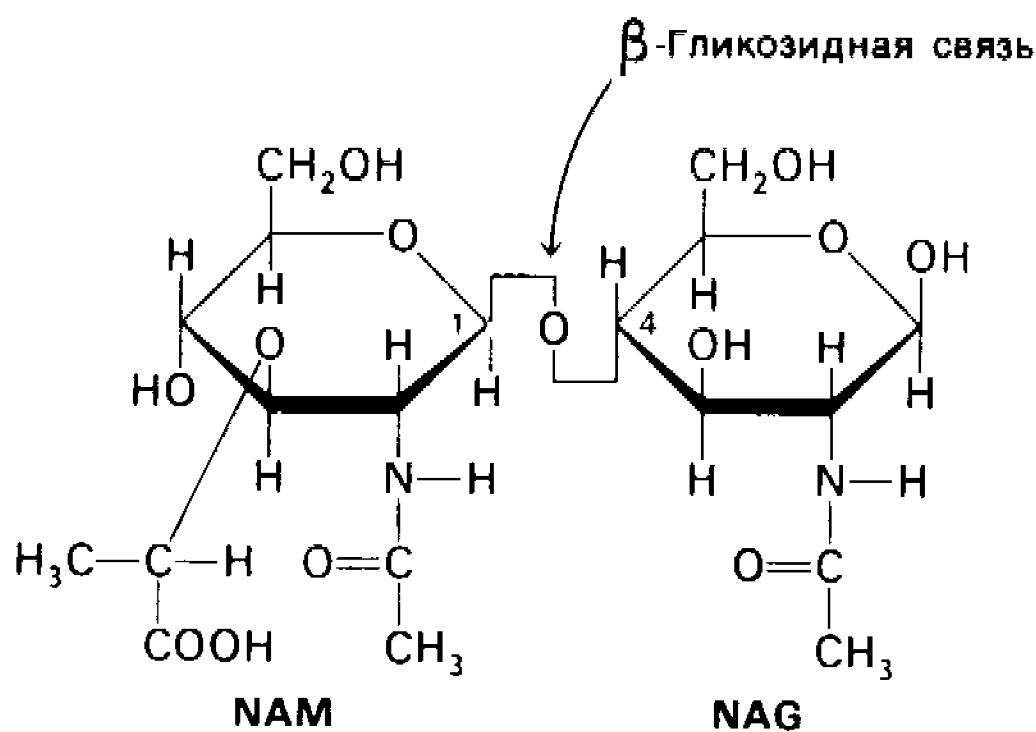


Рис. 7.3. NAM связана с NAG гликозидной связью β(1 → 4).

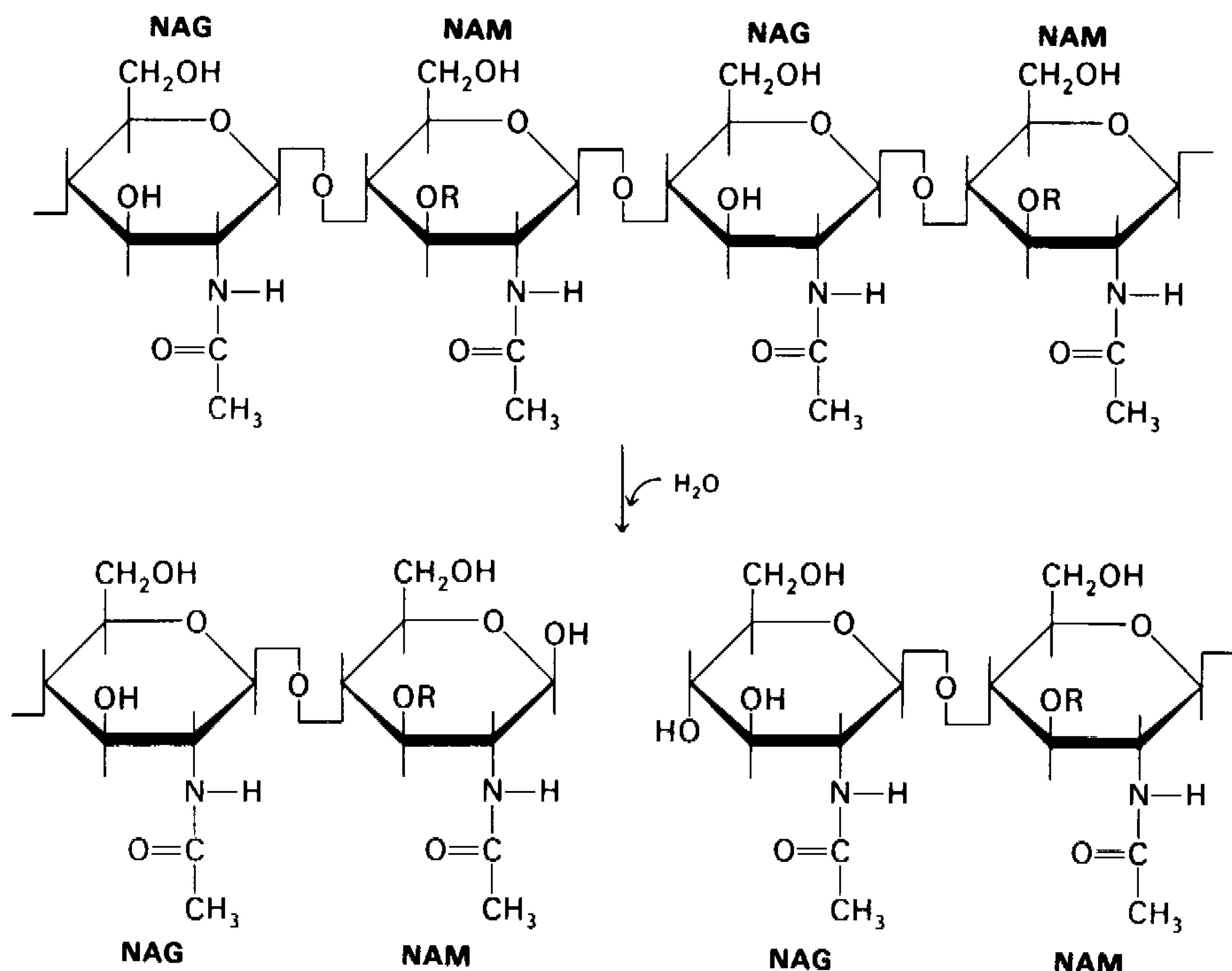


Рис. 7.4. Лизоцим гидролизует гликозидную связь между NAM и NAG (R-лактильный остаток NAM).

очень сложный характер. В ней содержится гораздо меньше α-спиралей, чем в миоглобине и гемоглобине. В некоторых участках полипептидная цепь имеет вытянутую конформацию. В одном из этих участков цепь делает поворот и идет в обратном направлении параллельно самой себе; при этом два параллельных тяжа соединяются водородными связями, образующимися между пептидными группами. Такие участки «шпильки для волос» подобны упоминавшимся выше *антипараллельным* β-*складчатым слоям* - регулярно повторяющимся участкам вторичной структуры в белке шелка. Внутренняя часть молекулы лизоцима, подобно молекулам миоглобина и гемоглобина, почти полностью неполярна. Очевидно, что, как и в случае большинства других белков, гидрофобные взаимодействия играют важную роль в образовании третичной структуры лизоцима.

7.3. Поиски активного центра лизоцима

Детальное воспроизведение трехмерной структуры лизоцима еще не раскрывало механизма его каталитического действия. Более того, рассматривая карту электронной плотности, трудно было определить хотя бы локализацию активного центра. В отличие от миоглобина и гемоглобина в лизоциме нет простетической группы, т.е. нет встроенного маркера активного центра. В итоге основную информацию, необходимую для идентификации активного центра, определения способа связывания субстрата и выяснения механизма ферментативного действия, удалось получить только при использовании ингибиторов, а именно при рентгеноструктурном анализе комплексов лизоцима с ингибиторами. Если трехмерная структура белка известна, то определить методом рентгеноструктурного анализа способ связывания с ним небольших молекул обычно уже нетрудно. Эти опыты легко выполнимы, потому что кристаллы белка очень пористы. Даже относительно большие молекулы ингибитора способны диффундировать по каналам между молекулами белка, попадая в участки специфического связывания. Изменение электронной плотности, обусловленное встраиванием дополнительной молекулы, можно рассчитать непосредственно по интенсивности рефлексов

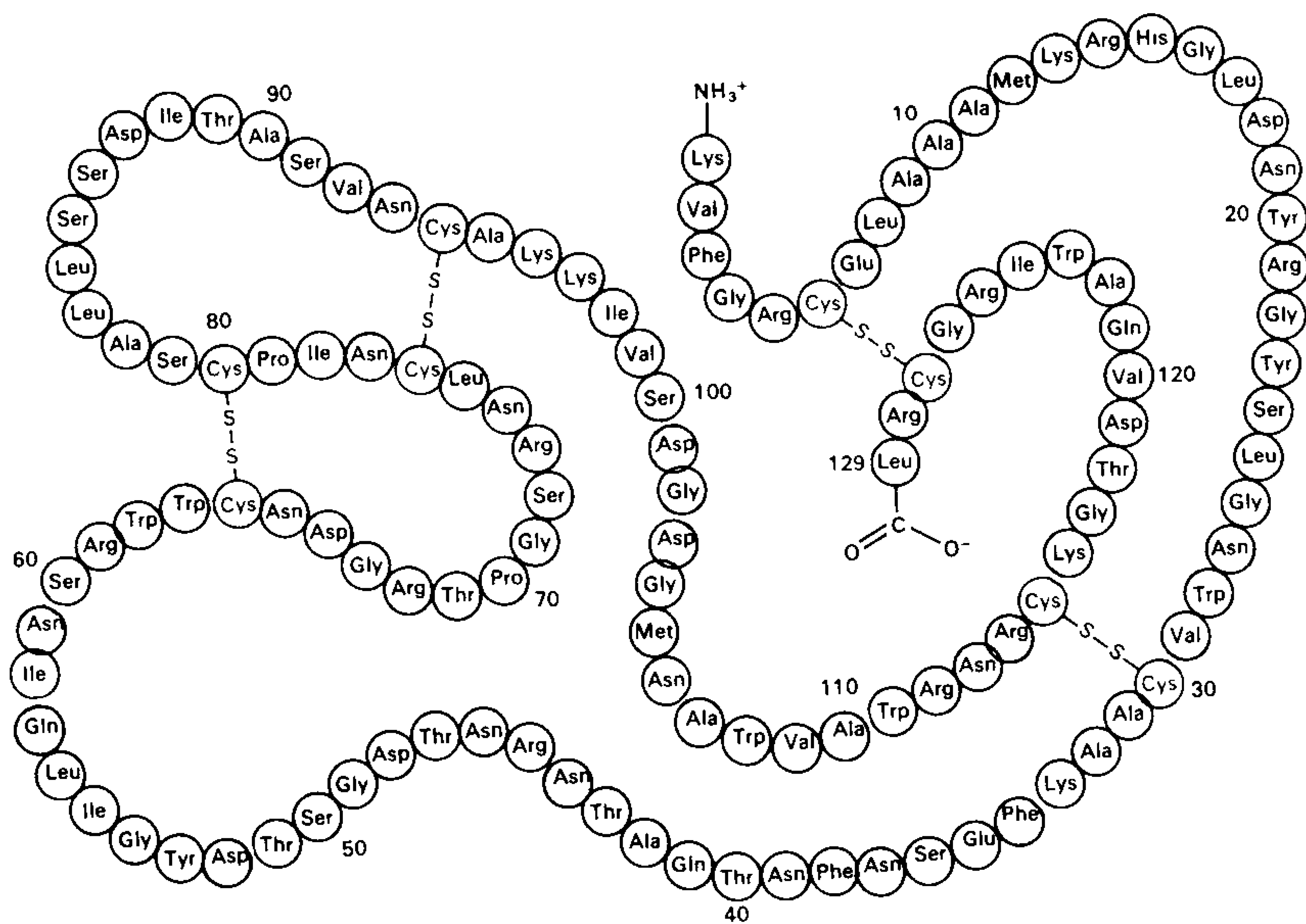


Рис. 7.5. Последовательность аминокислот в лизоциме из белка куриных яиц. Красным показаны остатки, входящие в состав активного центра. [Canfield R. E., Liu A. K., J. Biol. Chem., **240**, 2000 (1965); Phillips D. C., Sci. Amer., (5) **215**, 79 (1966).]

В идеале следовало бы использовать разностный метод Фурье для определения структуры фермент-субстратного (ES) комплекса в процессе катализа. Однако в обычных условиях превращение связанного субстрата в продукт реакции происходит значительно быстрее, чем диффузия новых молекул субстрата в кристалл. В некоторых случаях это осложнение удается устранить (используя данные, полученные предварительно на нативном белке) при условии, что структура кристалла не претерпела существенных изменений. Такой подход получил название *разностного метода Фурье.*

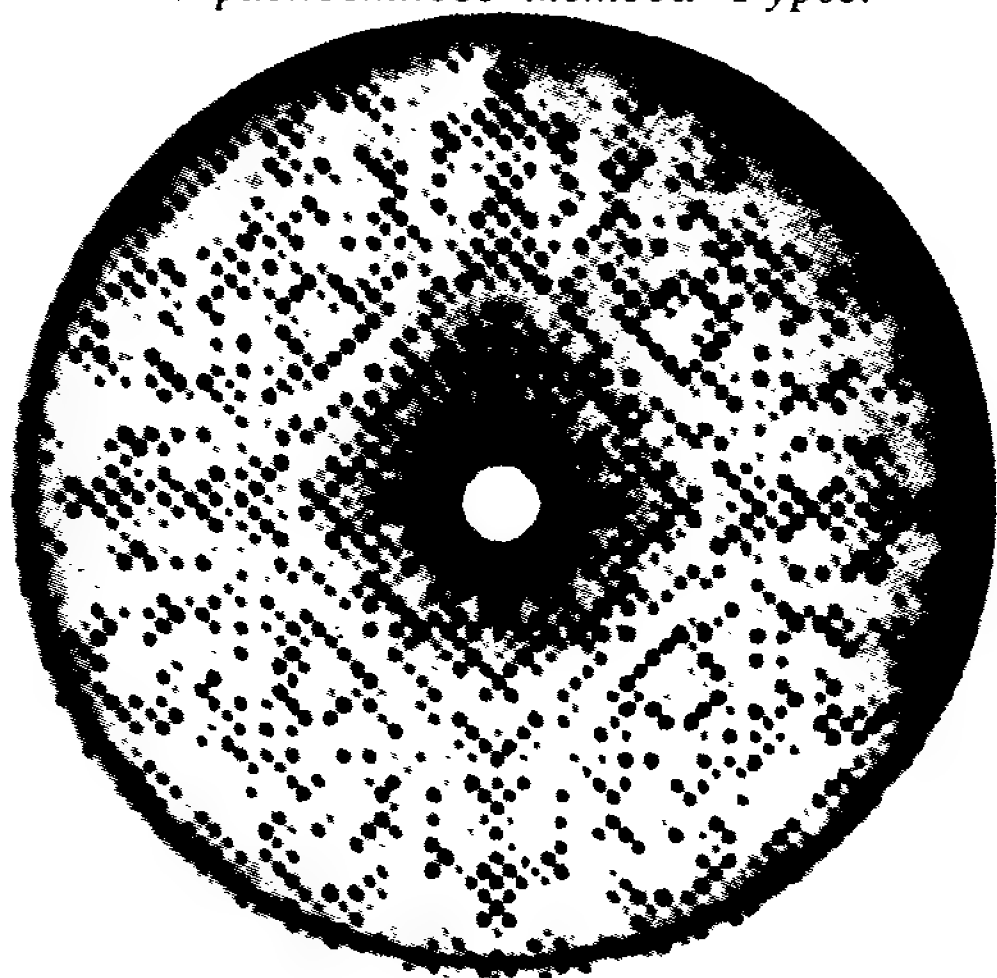


Рис. 7.6. Рентгенограмма кристалла лизоцима. (Печатается с любезного разрешения д-ра D. Phillips.)

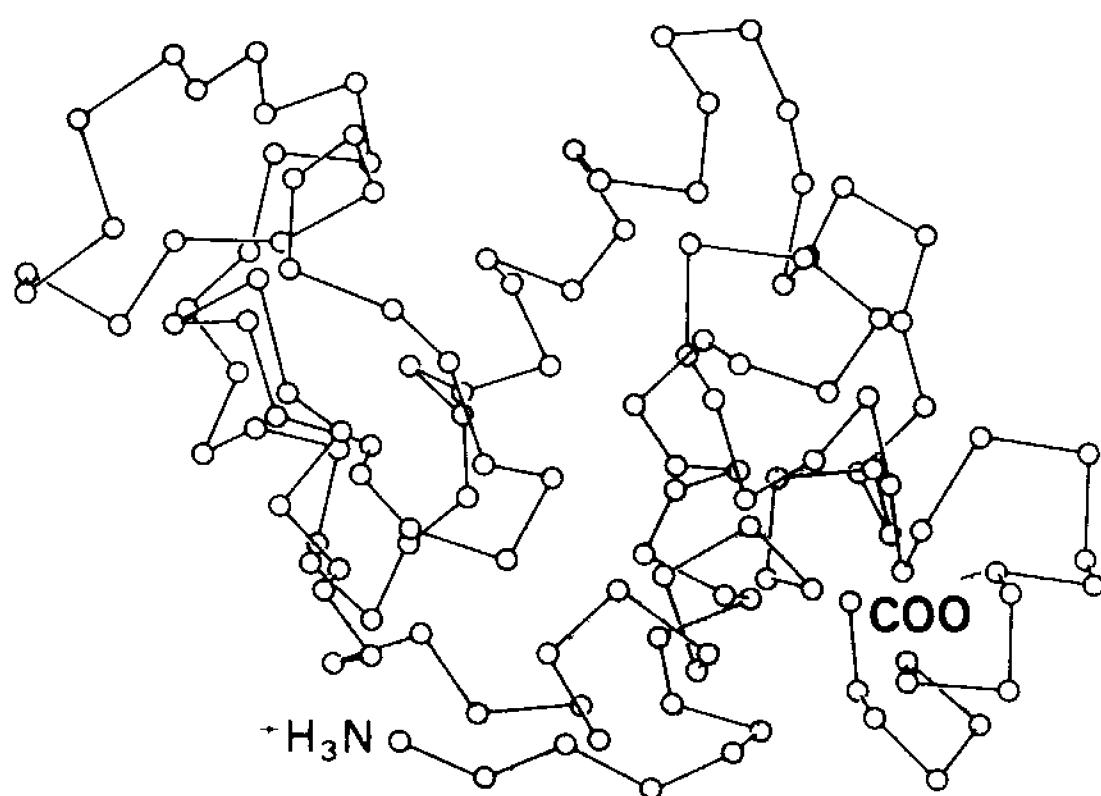


Рис. 7.7. Трехмерная структура лизоцима. Показаны только α-углеродные атомы. (Печатается с любезного разрешения д-ра D. Phillips.)

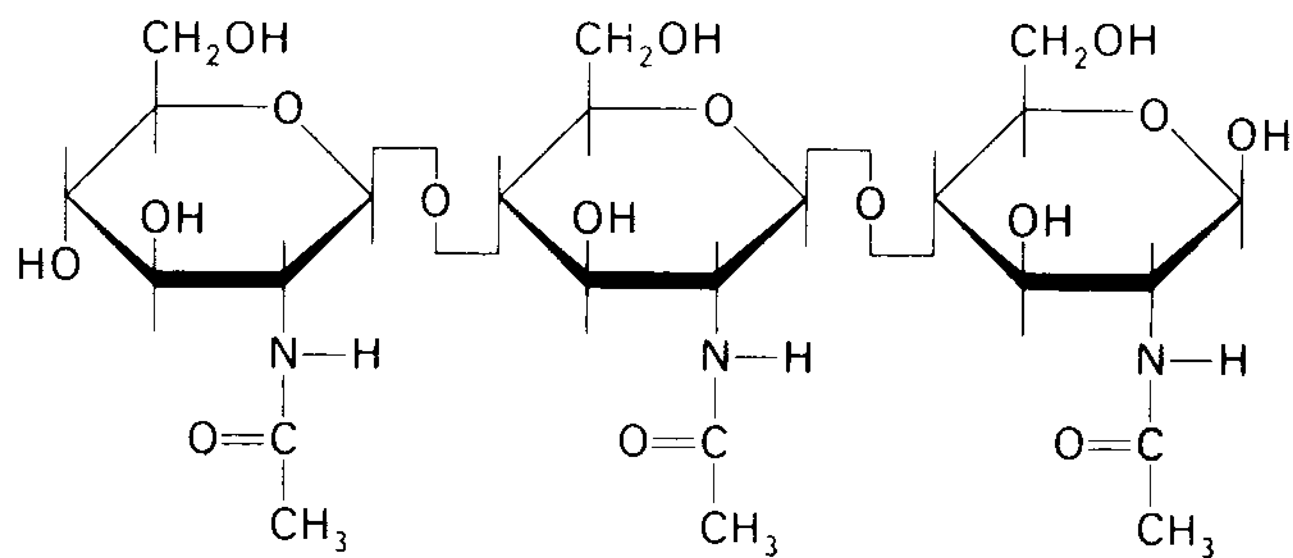


Рис. 7.8. Формула три-N-ацетилглюкозамина (три-NAG, или NAG_3) – конкурентного ингибитора лизоцима.

замедлением каталитического процесса, что достигается путем сильного охлаждения кристалла (например, до – 50°С). Этот экспериментальный подход получил название *криоэнзимологии.* Существует и другой подход: исследуют комплекс фермента с таким аналогом субстрата, который либо совсем не подвергается никаким превращениям, либо эти превращения происходят очень медленно. Для лизоцима таким аналогом субстрата оказался тример N-ацетилглюкозамина (три-NAG, или NAG_3), структура которого показана на рис. 7.8. Олигомеры N-ацетилглюкозамина, содержащие менее 5 остатков, гидролизуются крайне медленно или не гидролизуются совсем. Тем не менее они связываются с активным центром фермента. Именно поэтому три-NAG является мощным конкурентным ингибитором лизоцима.

7.4. Способ связывания конкурентного ингибитора

Рентгеноструктурное исследование комплекса лизоцима с три-NAG позволило установить локализацию активного центра и выявило, какие взаимодействия обеспечивают специфическое связывание субстрата; на этой основе была разработана гипотеза, предсказывающая детальный механизм ферментативного действия лизоцима. Оказалось, что три-NAG присоединяется к лизоциму в щели на его поверхности, занимая при этом примерно половину щели. Связывание происходит в результате образования водородных связей и вандерваальсовых взаимодействий. Электростатические взаимодействия отсутствуют, поскольку в три-NAG нет ионных групп.

Водородные связи между три-NAG и лизоцимом показаны на рис. 7.9. Карбоксильная группа аспартата-101 образует водородные связи с остатками А и В. Наиболее специфические и прочные водородные связи образуются между ферментом и остатком С ингибитора. Здесь появляются четыре водородные связи. NH-группа индольного кольца триптофана-62 соединяется водородной связью с кислородом при С-6. Соседний аминокислотный остаток – триптофан-63 – аналогичным образом связывается с кислородом, стоящим при С-3. Когда три-NAG присоединяется к ферменту, кольцо триптофана-62 перемещается на 0,75 Å. Прочные водородные связи формируются между СО- и NH-группами ацетамидной боковой цепи остатка сахара С и NH- и СО-группами основной цепи белка, принадлежащими соответственно 59-му и 107-му аминокислотному остатку.

Между три-NAG и ферментом возникает большое число *контактов, обусловленных вандерваальсовыми взаимодействиями.* Остаток сахара В вовлечен в малое количество полярных контактов с ферментом, но он тесно связан с индольным кольцом триптофана-62. Остаток А довольно слабо контактирует с ферментом.

7.5. От структуры фермента – к механизму ферментативного действия

1. *Как происходит связывание субстрата?* Мы уже говорили о том, что метод рентгеноструктурного анализа не дает возможности непосредственно определить, как происходит связывание с ферментом эффективного субстрата. Однако данные, полученные при рентгеноструктурном анализе комплекса фермент—конкурентный ингибитор, могут сыграть ключевую роль в решении этой

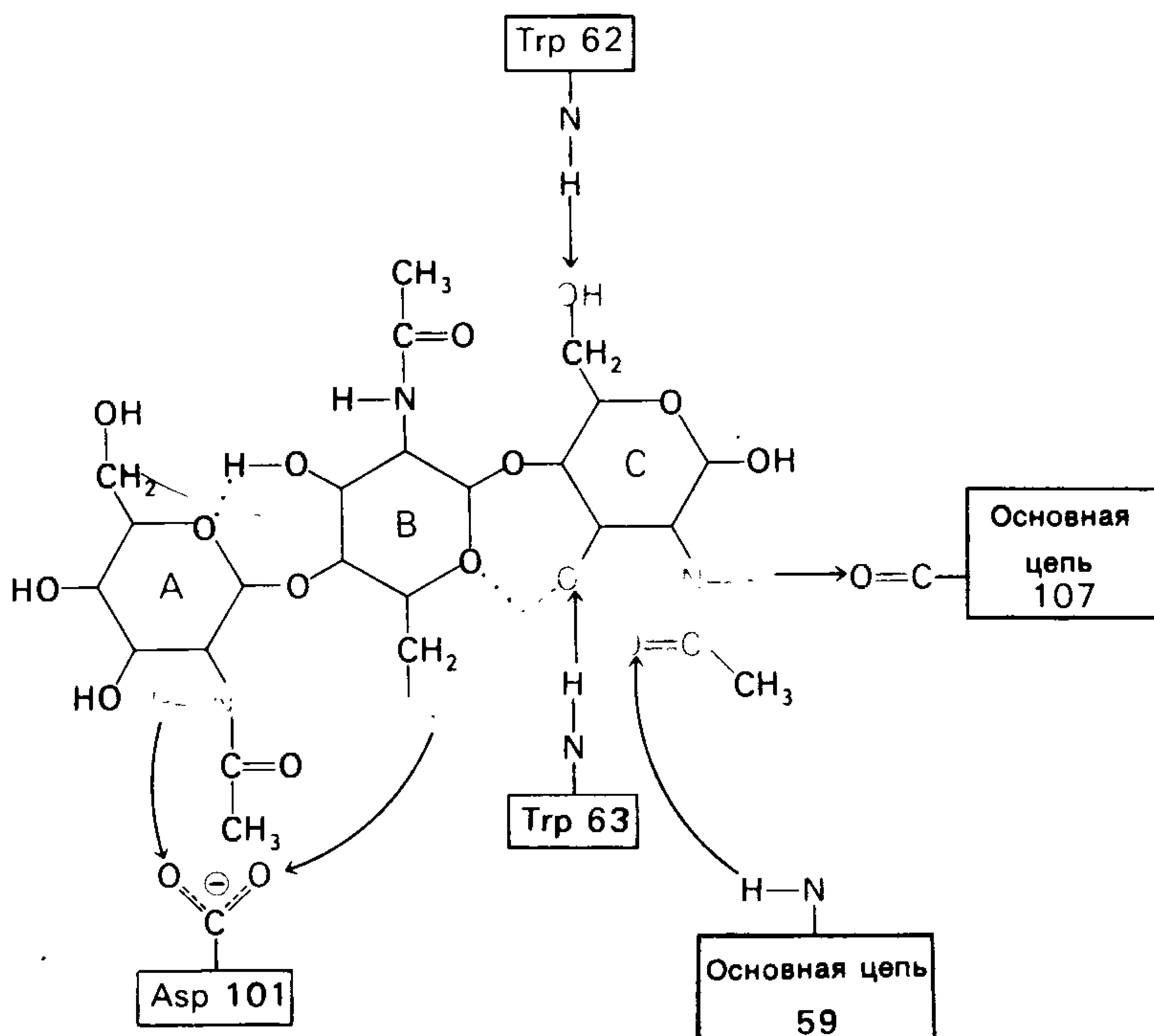


Рис. 7.9. Водородные связи между три-NAG и лизоцимом. Участвующие в образовании водородных связей химические группы субстрата показаны синим, соответствующие группы фермента – красным.

проблемы. Три-NAG заполняет только половину щели в молекуле лизоцима. Это очень многообещающее исходное положение. Было сделано допущение, что наблюдаемое связывание три-NAG как ингибитора происходит с образованием тех же связей, которые возникают и при связывании субстрата. Вполне вероятно, что для образования реакционноспособного ES-комплекса требуются дополнительные остатки сахара, способные заполнить вторую половину щели. Действительно, после присоединения три-NAG в щели остается место еще для трех остатков сахара. Это обнадеживало, поскольку было известно, что гексамер N-ацетилглюкозамина (гекса-NAG) быстро гидролизуется ферментом.

При тщательном построении моделей в щели на ферменте поместились три дополнительных остатка сахара, обозначенных D, E и F (рис. 7.10). Остатки E и F подошли прекрасно, образуя несколько прочных водородных связей и контактов, обусловленных вандерваальсовыми взаимодействиями. Однако остаток D входил в щель только при условии некоторой деформации. При нормальной конформации (в виде кресла) его атомы C-6 и O-6 оказывались слишком сближенными с некоторыми группами на ферменте.

2. *Какая из связей расщепляется ферментом?* Скорость гидролиза олигомеров N-ацетилглюкозамина стремительно возрастает при увеличении числа остатков сахара от 4 до 5, т. е. от NAG_4 до NAG_5 (табл. 7.1). Удлинение субстрата еще на один остаток (NAG_6) дает дополнительное увеличение скорости расщепления; однако возрастание числа остатков сахара в субстрате до 8 уже не оказывает действия. Эти данные согласуются с результатами рентгеноструктурного исследования, показавшими, что именно шести остатков сахара достаточно для заполнения щели, где расположен активный центр.

Какая из связей в гекса-NAG расщепляется ферментом? Исходя из того, что три-NAG не подвергается расщеплению, можно считать, что связь A—B (т. е. гликозидная связь между остатками A и B) – это не та связь, на которую действует фермент. Аналогично этому фермент не может расщеплять и связи B—C. Второе и решающее доказательство того, что связь B—C не

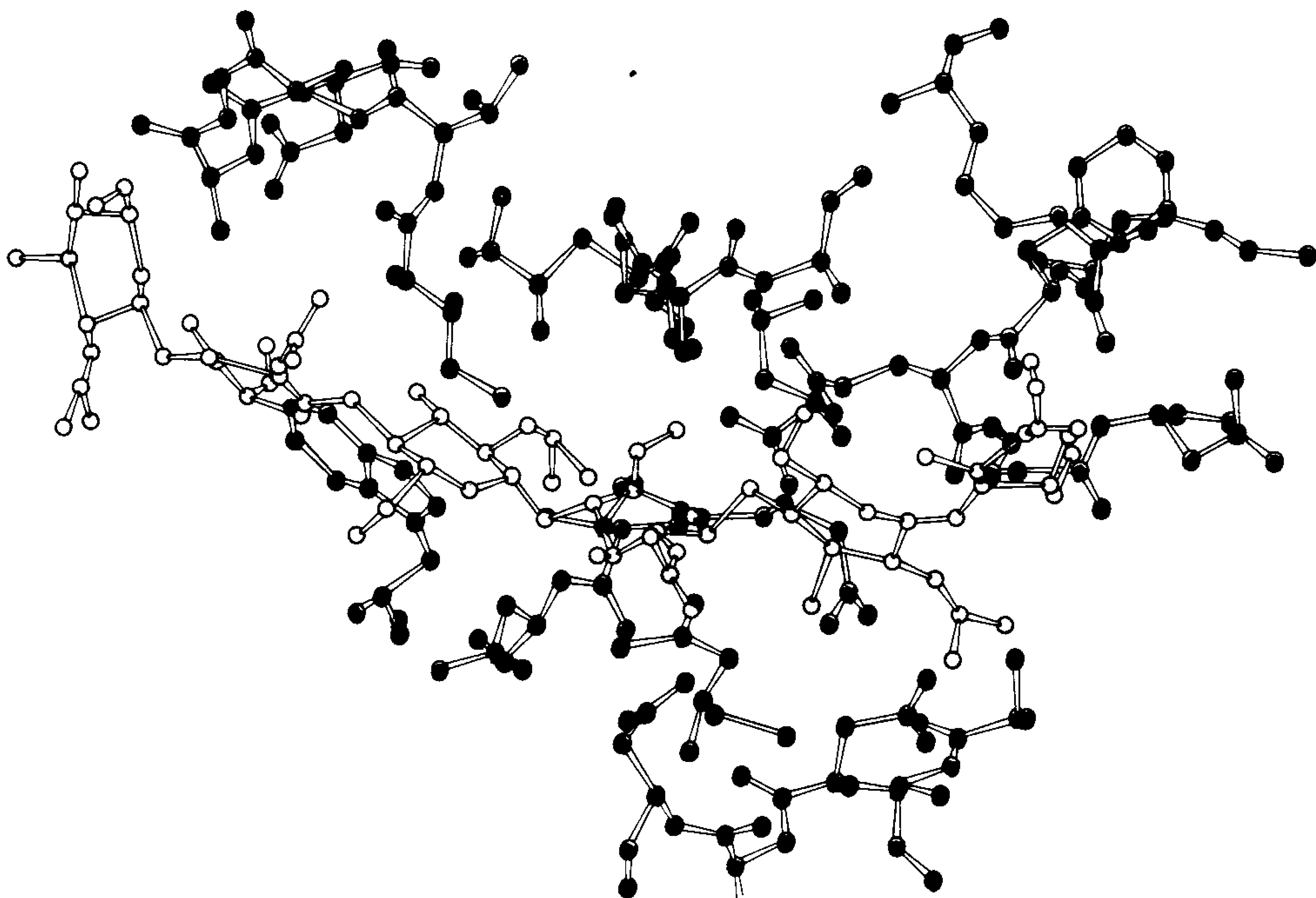


Рис. 7.10. Способ связывания гекса-NAG (показан желтым) с лизоцимом. Расположение углеводных остатков A, B и C (*слева*) соответствует локализации три-NAG в комплексе с лизоцимом; расположение остатков D, E и F (*справа*) предсказали путем модельного построения. Зеленым показаны два аминокислотных остатка, непосредственно участвующих в катализе.

расщепляется ферментом, состоит в том, что NAM не может встать в положение остатка C. Если NAG отлично умещается в участке C, то NAM здесь не умещается из-за лактильной боковой цепи. Между тем в полисахариде клеточной стенки бактерий лизоцим расщепляет связь NAM—NAG. Следовательно, и связь C—D не может подвергаться расщеплению, если действительно полисахарид клеточных стенок бактерий связывается с лизоцимом таким же образом, как и гекса-NAG. Несоответствие NAM положению C исключает еще одно место гидролиза, а именно связь E—F. Вспомним, что полисахарид клеточной стенки - это чередующийся полимер NAM и NAG; следовательно, если NAM не может занимать положение C, то этот остаток не может стоять и в положении E.

Из приведенных соображений вытекает, что при расщеплении ферментом гексамерного субстрата связи A—B, B—C, C—D и E—F не могут разрываться. Следовательно, *единственным возможным местом расщепления субстрата является связь D—E* (рис. 7.11).

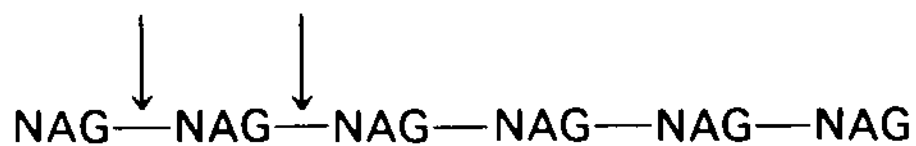
3. *Какая группа на ферменте непосредственно осуществляет катализ?* Заключение о том, что гидролиз субстрата происходит по связи D—E, позволило перейти да-

Таблица 7.1. **Эффективность олигомеров N-ацетилглюкозамина в качестве субстратов**

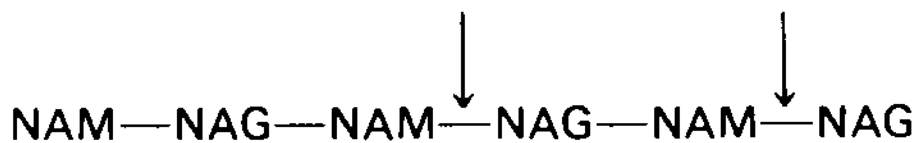
Субстрат	Относительная скорость гидролиза
NAG_2	0
NAG_3	1
NAG_4	8
NAG_5	4 000
NAG_6	30 000
NAG_8	30 000

Участки связывания

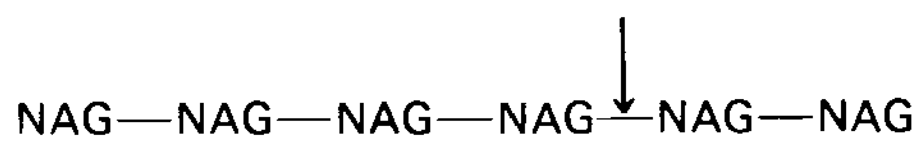
A	B	C	D	E	F



Исключается, поскольку три-NAG не гидролизуется



Исключается, поскольку NAM слишком велик для участка C



Единственно возможное место гидролиза

Рис. 7.11. Ход рассуждений, доказывающих, что место приложения действия фермента – гликозидная связь между углеводными остатками D и E.

лее к выявлению тех групп на ферменте, которые непосредственно осуществляют реакцию гидролиза. Для этого, однако, нужно еще более точно локализовать место расщепления субстрата, а именно выяснить, по какую сторону от гликозидного атома кислорода происходит разрыв связи. Ответ на этот вопрос был получен в опытах по ферментативному гидролизу в среде, содержащей воду, меченную стабильным тяжелым атомом кислорода ^{18}O (рис. 7.12). В выделенных по окончании гидролиза сахарах ^{18}O оказался присоединенным к C-1 остатка D, тогда как гидроксильная группа при C-4 в остатке E содержала обычный изотоп кислорода. *Отсюда следует, что при гидролизе разрыв связи происходит между C-1 остатка D и кислородом гликозидной связи, примыкающим к остатку E.* Эта работа может служить примером использования изотопов в изучении механизма ферментативного катализа. Без изотопов было бы крайне трудно, а может быть, и невозможно в данном случае установить точное место приложения действия фермента.

Затем перешли к поиску возможных каталитических групп, которые должны располагаться вблизи расщепляемой гликозидной связи. Как указывалось в предыдущей главе, под *каталитическими группами* подразумевают те группы фермента, которые непосредственно участвуют в образовании или разрыве ковалентных связей. Наиболее подходящие кандидаты на эту роль – это группы, способные к образованию *водородных связей в качестве доноров или акцепторов водорода.* Отрыв или присоединение иона водорода – это критический этап большинства ферментативных реакций. В лизоциме единственные остатки, способные быть каталитическими и расположенные вблизи расщепляемой гликозидной связи, – это аспартат-52 и глутамат-55. Остаток аспарагиновой кислоты лежит по одну сторону от гликозидной связи, а остаток глутаминовой – по другую. Окружение этих двух кислотных боковых цепей совершенно различно. Аспартат-52 находится в полярном окружении, где он служит акцептором водорода в сложной сети водородных связей. Глутамат-35, напротив, расположен в неполярной области. Отсюда следует, что при

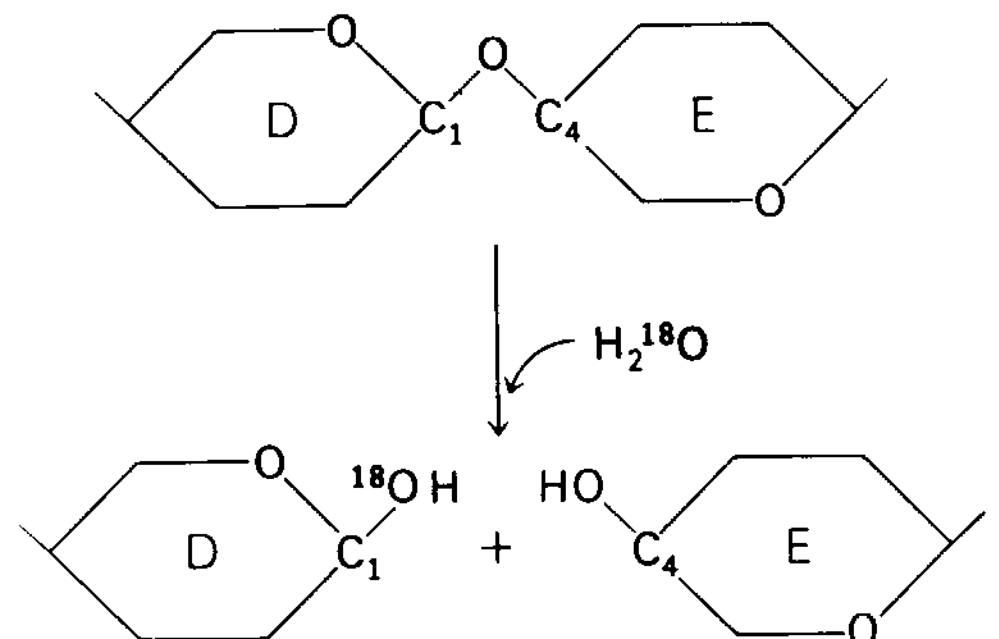


Рис. 7.12. Проведение гидролиза в меченной ^{18}O воде показало, что лизоцим расщепляет связь между C-1 и O, но не связь между C-4 и O (изображен только скелет остатков D и E).

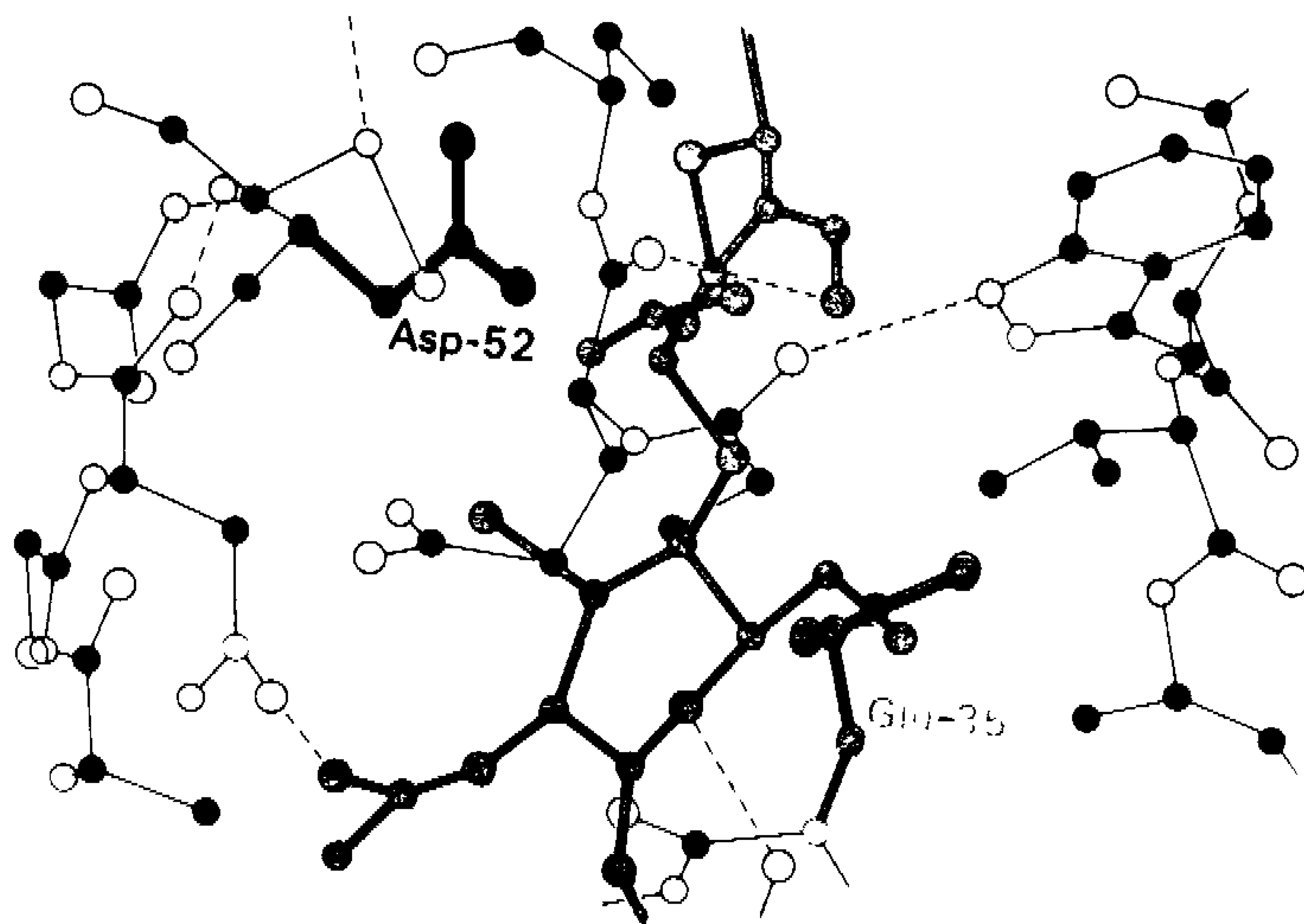


Рис. 7.13. Структура части активного центра лизоцима. Желтым показаны кольца D и E субстрата гекса-NAG. Вблизи субстрата расположены боковые цепи аспартата-52 (красное) и глутамата-35 (зеленое). [Lipscomb W. N., Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res, **15**, 150 (1971.)]

pH 5, оптимальном pH для гидролиза лизоцимом хитина, *аспарагиновая кислота в положении 52 должна находиться в ионизированной COO^--форме, тогда как глутаминовая кислота в положении 35 – в неионизированной COOH-форме.* Расстояние между гликозидной связью и ближайшим к ней атомом кислорода как одной, так и другой кислотной группы составляет примерно 3 Å (рис. 7.13).

7.6. Промежуточное образование иона карбония – критический этап катализа

На основе изложенных структурных данных Филлипс (Phillips) и сотрудники детально разработали вероятный механизм каталитического действия лизоцима. В каталитическом цикле они выделили следующие важные этапы.

1. —COOH-группа остатка 35 передает H^+ на связь между С-1 кольца D и гликозидным атомом кислорода; в результате данная связь расщепляется (рис. 7.14).

2. Это создает положительный заряд на С-1 кольца D. Образовавшийся короткоживущий продукт называется *ионом карбония*, поскольку он содержит положительно заряженный атом углерода.

3. Димер NAG, состоящий из остатков E и F, отдаляется от фермента в результате диффузии.

4. Образовавшийся в качестве промежуточного продукта ион карбония реагирует с OH^--группой растворителя (рис. 7.15). Тетра-NAG, состоящий из остатков A, B, C и D, отдаляется от фермента путем диффузии.

5. Глутамат-35 вновь протонируется, и фермент может вступать в новый каталитический цикл.

Основные элементы этой схемы катализа следующие.

1. *Общий кислотный катализ.* Источник протона – глутамат-35, который находится в неионизированной форме и отстоит от гликозидного атома кислорода на оптимальное расстояние – 3 Å.

2. *Образование в качестве промежуточного продукта иона карбония.* Два разных по своей природе фактора, оказывающих стабилизирующий эффект на ион карбония, значительно облегчают осуществление ферментативной реакции. К ним относятся:

а. Электростатический фактор, т. е. присутствие отрицательно заряженной группы поблизости (в 3 Å) от образующегося в качестве промежуточного продукта иона карбония. Аспартат-52, находящийся в форме отрицательно заряженного карбоксилат-иона, электростатически взаимодействует с положительным зарядом на С-1 кольца D.

б. Геометрический фактор, а именно деформация кольца D (рис. 7.16). Гекса-NAG размещается наилучшим образом в щели активного центра фермента при условии,

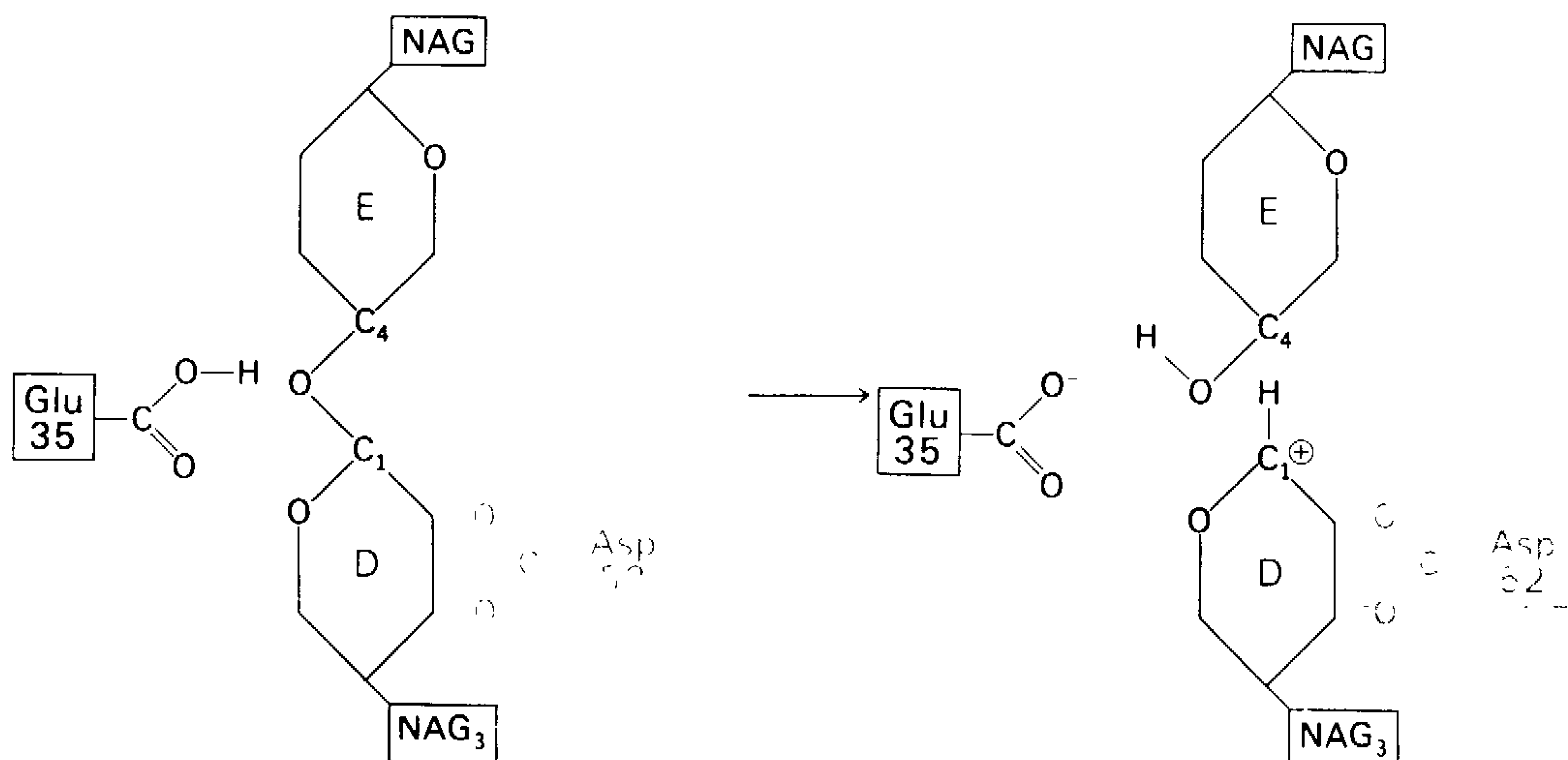


Рис. 7.14. Первый этап постулированного механизма действия лизоцима – перенос H^+ от Glu 35 на атом кислорода гликозидной связи. При этом происходит расщепление гликозидной связи и образование иона карбония.

что геометрия кольца D меняется от конформации кресла к конформации полукресла. Такая деформация способствует ускорению катализа, так как при конформации полукресла значительно облегчается образование иона карбония. Расположение углеродных атомов 1, 2 и 5 и кислородного атома кольца в одной и той же плоскости при конформации полукресла приводит к тому, что положительный заряд распределяется между С-1 и атомом кислорода кольца. Таким образом, *связывая субстрат, фермент заставляет его принимать форму переходного состояния*, а именно форму иона карбония.

7.7. Экспериментальное доказательство предложенного механизма ферментативного катализа

Основанная на рентгеноструктурных данных гипотеза о характере связывания субстрата и механизме катализа была проверена постановкой многочисленных химических экспериментов. Все полученные результаты подтверждают правильность выдвинутой гипотезы. Приведем ряд наиболее существенных экспериментальных доказательств.

1. *Способ расщепления субстрата.* В соответствии с предположением о том, что расщепление гексамера происходит между 4-м и 5-м остатками, оказалось, что действительно гекса-NAG расщепляется на тетра-

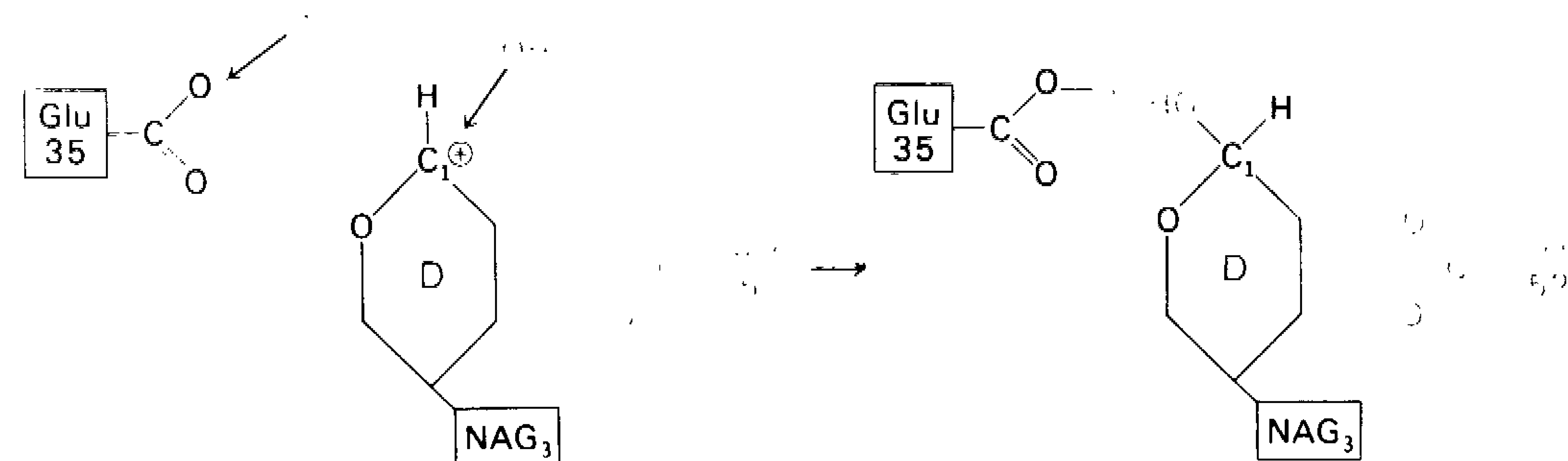
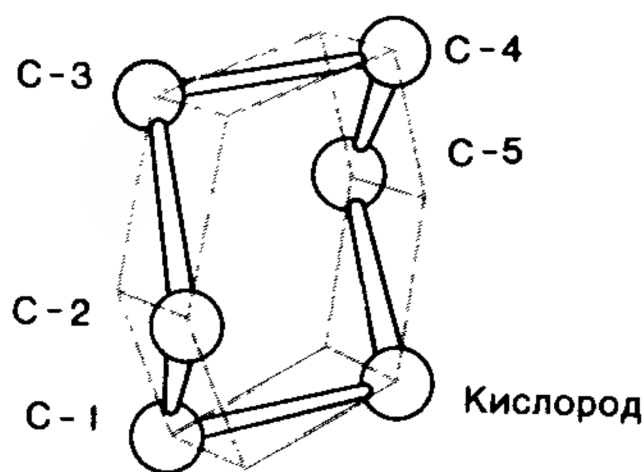
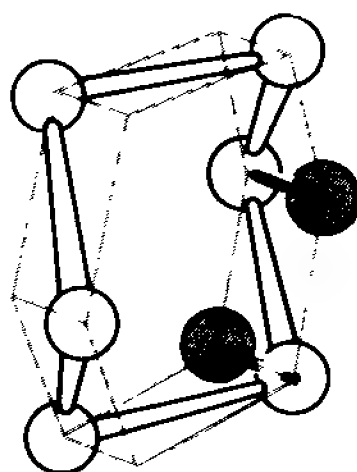


Рис. 7.15. Реакция гидролиза завершается присоединением OH к промежуточно образовавшемуся иону карбония и H^+ к боковой цепи Glu 35.





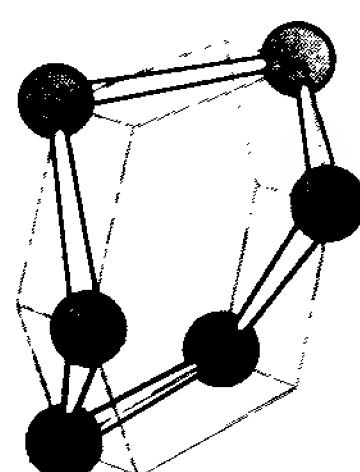


Рис. 7.16. Изменение конформации кольца D субстрата лизоцима в конформацию полукресла. *А* – углеводный остаток в обычной конформации кресла; *Б* – при связывании с лизоцимом атом кислорода кольца и С-5 в углеводном остатке D перемещаются так, что С-1, С-2, С-5 и О оказываются в одной плоскости, как это показано на рис. *В*. (Phillips D.C., The three-dimensional structure of an enzyme molecule, Copyright 1966 by Scientific American, Inc.)

NAG и ди-NAG (рис. 7.17).

2. *Сродство связывания.* Путем измерения равновесия при реакции связывания с ферментом каждого из шести сахаров определяли их вклад в общую величину свободной энергии связей, представленных в гексамере (рис. 7.18). Обнаружилось поразительное явление: вклад углеводного остатка D был отрицательным. На связывание остатка D расходовалось около 4 ккал/моль. Этот результат подтверждает гипотезу о деформации остатка D при связывании с ферментом: изменение от конформации кресла к конформации полукресла требует энергии. Любопытно также, что остаток С вносит наибольший положительный вклад в сродство связывания. Действительно, рентгеноструктурные данные показывают, что остаток С образует большое число водородных связей и вандерваальсовых взаимодействий.

3. *Аналоги переходного состояния.* Представление о деформации углеводного остатка D в конформацию полукресла – важный аспект постулированного механизма катализа, поскольку конформация полукресла характерна для переходного состояния. Как уже отмечено выше, это представление подтверждается данными о затрате энергии на присоединение остатка D – энергии, расходуемой на деформацию. Другое подтверждение было получено при изучении аналога переходного состояния субстрата, т.е. соединения, имеющего как *до*, так и *после* связывания с ферментом такую же геометрию, как субстрат в переходном состоянии. Кольцо D лактонного аналога тетра-NAG (рис. 7.19) в кристалле тетрасахарида имеет конформацию полукресла. При связывании с лизоцимом атомы С-1, С-2, С-4, С-6 и кислородный атом кольца D этого аналога располагаются в одной плоскости. Такая конформация «софы» сходна с постулированной для переходного состояния конформацией полукресла; это означает, что лактонный аналог в отличие от тетра-NAG при связывании с лизоцимом деформируется очень мало. Оказалось, что лактонный аналог связывается с лизоцимом (в участках связывания от А до D) в 3600 раз сильнее, чем тетра-NAG. Отсюда вытекает, что *при деформации кольца D нормального субстрата скорость расщепления может возрасти примерно в 3600 раз.*

Роль этого фактора в катализе ясно предвидел Полинг (Pauling), о чем свидетель-

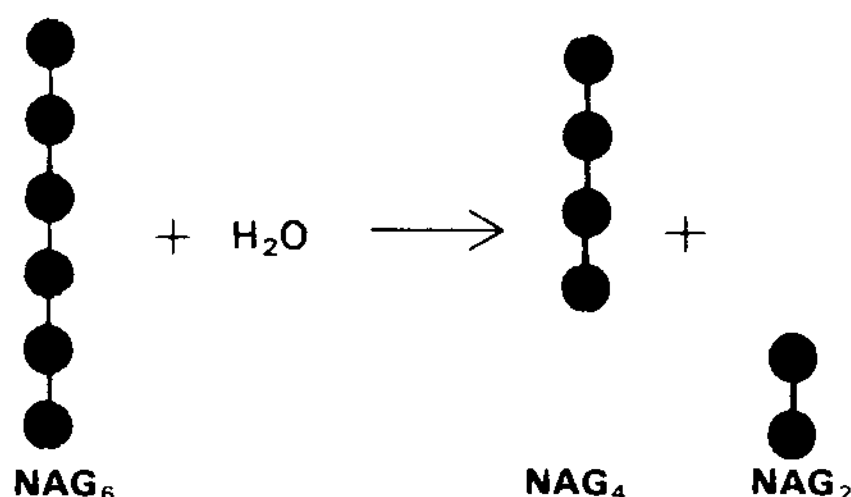


Рис. 7.17. Гекса-NAG гидролизуется с образованием тетра-NAG и ди-NAG.

ствует его лекция, читанная в 1948 г.:

«Я полагаю, что ферменты – это молекулы, которые по структуре комплементарны активированным комплексам тех реакций, которые они катализируют, т. е. молекулярной структуре, промежуточной между реагирующими веществами и продуктами реакции в данном каталитическом процессе. Сила притяжения молекулы фермента к активированному комплексу приводит к снижению энергии последнего, а следовательно, к снижению энергии активации данной реакции и возрастанию скорости реакции».

4. *Зависимость скорости каталитической реакции от pH.* Скорость гидролиза хитина достигает наиболее высоких значений при pH 5 (рис. 7.20). По обе стороны от этого оптимума ферментативная активность резко падает. Снижение активности при сдвиге pH в щелочную сторону обусловлено ионизацией глутамата-35, тогда как при сдвиге pH в кислую сторону – протонированием аспартата-52. Лизоцим проявляет ферментативную активность только при условии, что глутамат-35 находится в неионизированной

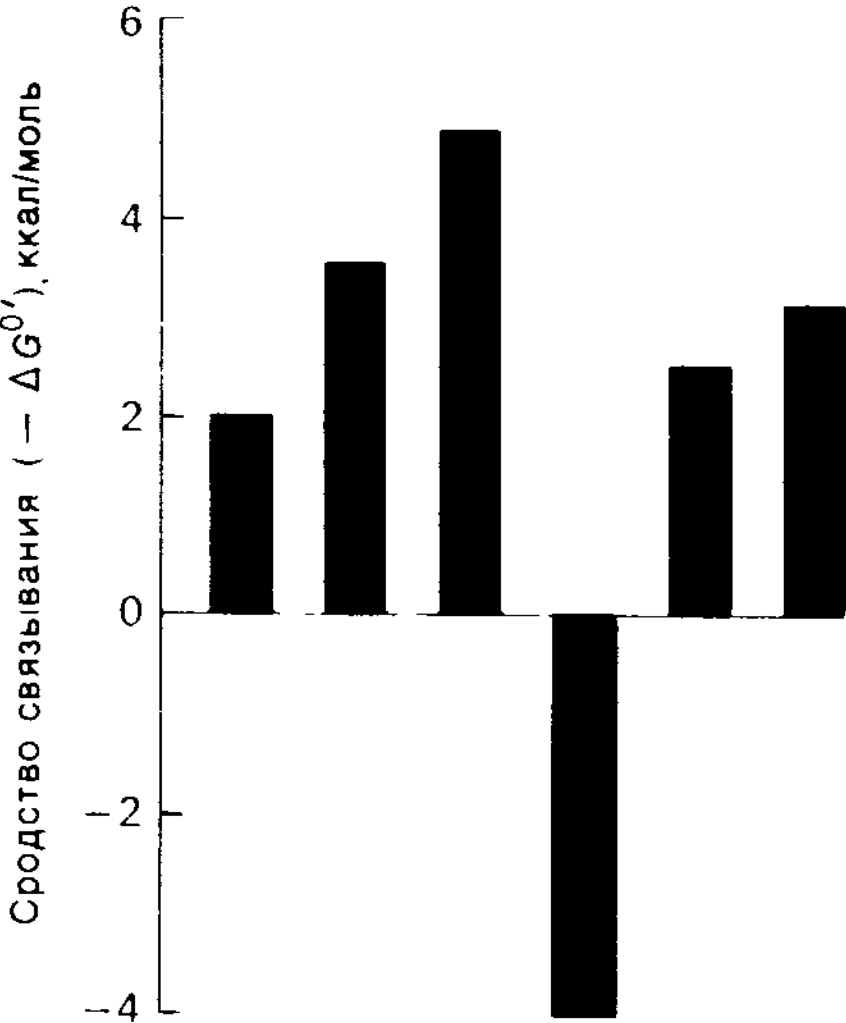


Рис. 7.18. Вклад каждого из шести углеводных остатков гекса-NAG в стандартную свободную энергию связывания этого субстрата. Связывание остатка D *идет с потреблением энергии.* Энергия расходуется на такое изменение формы остатка, чтобы он соответствовал активному центру фермента.

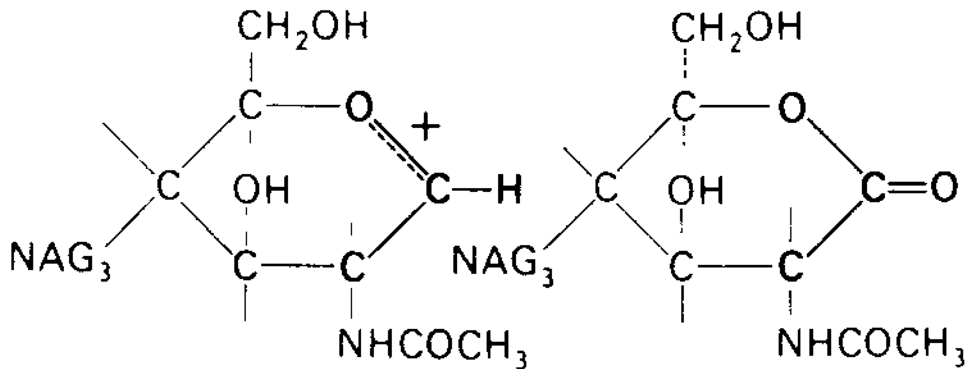


Рис. 7.19. Кольцо D лактонного аналога тетра-NAG имеет конформацию, похожую на полукресло, и в этом отношении сходно с промежуточным переходным состоянием в реакции, катализируемой лизоцимом.

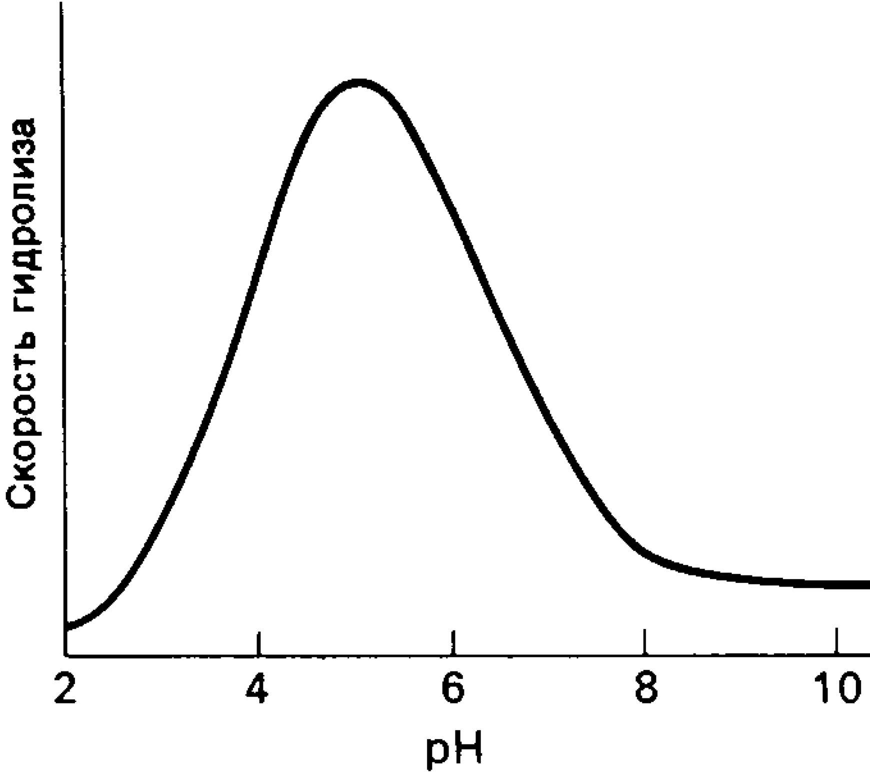


Рис. 7.20. Скорость гидролиза хитина (poly-NAG) лизоцимом как функция pH.

форме, а аспартат-52 – в ионизированной.

5. *Избирательная химическая модификация.* Лизоцим сохраняет ферментативную активность, если все имеющиеся в нем карбоксильные группы, за исключением карбоксильных групп глутамата-35 и аспартата-52, подвергнуть этерификации. Остатки 35 и 52 остаются немодифицированными, если этерификацию проводят в присутствии субстрата. При удалении субстрата аспартат-52 этерифицируется (тогда как глутамат-35 остается неизменным). Модификация аспартата-52 приводит к полной инактивации фермента. Это подтверждает предположение о том, что строгая ориентация карбоксилат-иона аспартата-52 необходима для

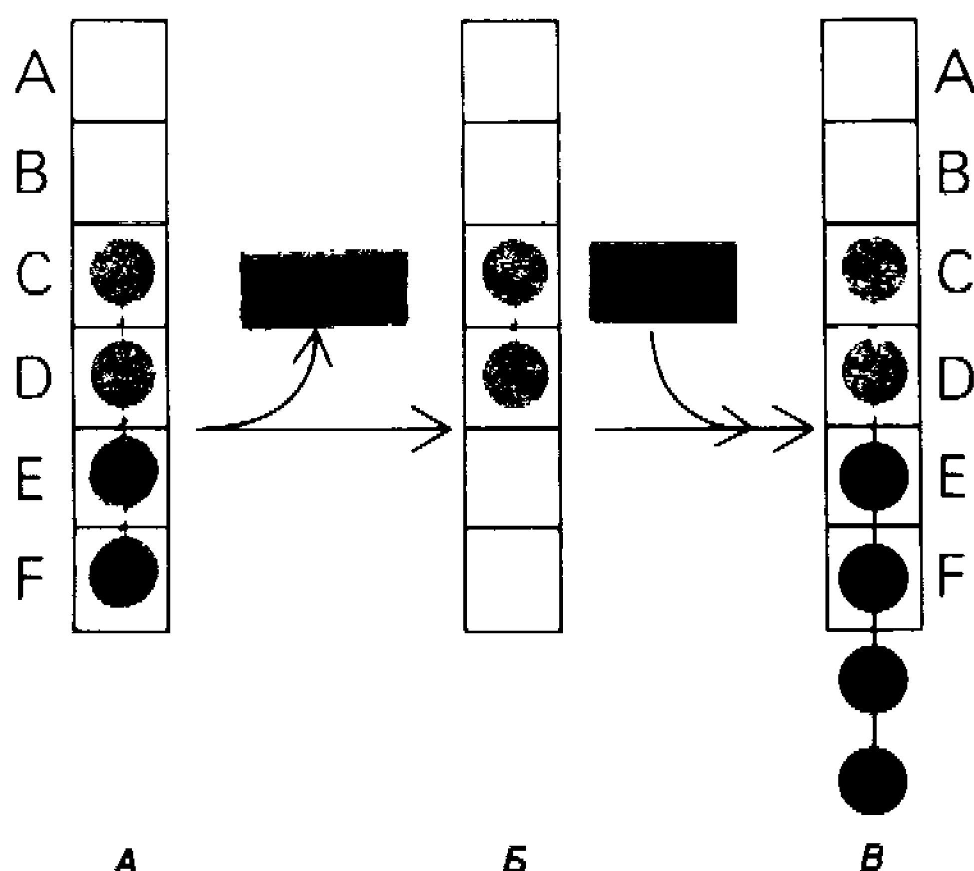


Рис. 7.21. Существование *промежуточного продукта гликозил–фермент* подтверждается способностью лизоцима катализировать, хотя и медленно, реакцию трансгликозилирования. NAG_4 (показан красным) соединяется с промежуточным продуктом гликозил фермент (показан синим на рис. *Б*), и в результате образуется NAG_6.

стабилизации образующегося в качестве промежуточного продукта иона карбония.

6. *Трансгликозилирование.* При добавлении к лизоциму тетра-NAG происходит медленное образование гекса-NAG и ди-NAG (рис. 7.21). Существование этой реакции, называемой трансгликозилированием, подтверждает наличие одного из важных элементов предложенного механизма ферментативной реакции, а именно образования в качестве *промежуточного продукта комплекса гликозил — фермент.*

При обычных гидролитических реакциях этот промежуточный продукт реагирует с OH^-. При трансгликозилировании в реакции используется вторая молекула углевода: ROH. Реакция трансгликозилирования специфична, так как акцептор связывается в участках E и F в щели активного центра. Более того, образующаяся гликозидная связь имеет β-конфигурацию, как и в субстрате. Таким образом, эти данные подтверждают правильность предполагаемой формы промежуточного продукта катализа.

7.8. Карбоксипептидаза А: протеолитический фермент, содержащий цинк

Перейдем теперь к карбоксипептидазе А– пищеварительному ферменту, гидролизующему С-концевую пептидную связь в полипептидах. Особенно легко гидролизуются пептиды, в которых С-концевой остаток имеет ароматическую или большую алифатическую боковую цепь (рис. 7.22). Этот фермент интересен в том отношении, что по механизму катализа он принципиально отличается от лизоцима. Прежде чем перейти к подробному обсуждению механизма действия карбоксипептидазы А, отметим два основных аспекта.

1. *Индуцированное соответствие.* Связывание субстрата сопровождается значительными изменениями структуры фермента.

2. *Смещение электронов.* В активном центре фермента содержатся атом цинка и другие группы, которые индуцируют перераспределение электронов в субстрате, облегчая тем самым процесс гидролиза.

Трехмерную структуру карбоксипептидазы А (рис. 7.23) при разрешении в 2 Å

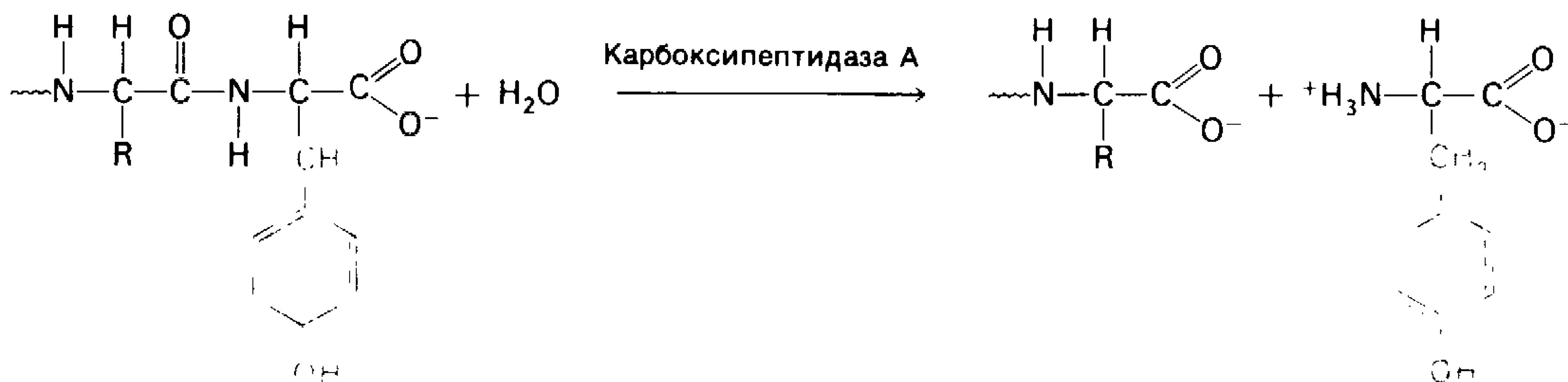


Рис. 7.22. Реакция, катализируемая карбоксипептидазой А.

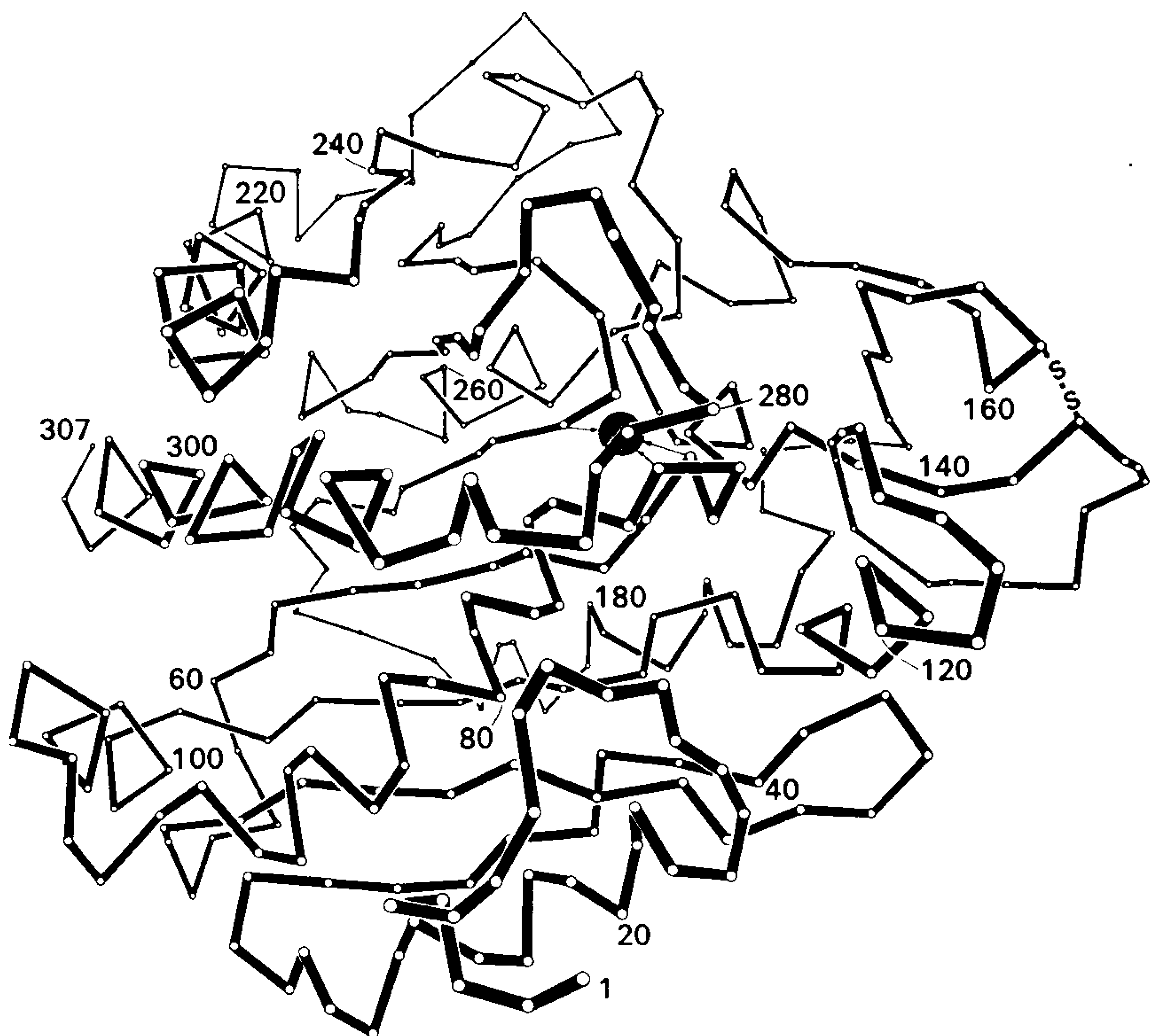


Рис. 7.23. Трехмерная структура карбоксипептидазы A. Показаны только α-углеродные атомы и ион цинка (заштрихованный кружок в центре). [Lipscomb W. N., Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res., **15**, 134 (1971).]

получил в 1967 г. Уилльям Липском (W. Lipscomb). Фермент содержит одну полипептидную цепь из 307 аминокислот, имеет компактную форму, которую можно приближенно описать как эллипсоидную с размерами 50 × 42 × 38 Å. 38 Å. В ферменте имеются области α-спиралей (38%) и β-складчатых слоев (17%). С белком прочно связан ион цинка, наличие которого необходимо для проявления ферментативной активности. Ион цинка расположен в углублении близко к поверхности молекулы, причем он образует координационные связи (в виде тетраэдра) с боковыми цепями двух гистидинов, боковой цепью глутамата и молекулой воды (рис. 7.24). Рядом с ионом цинка на ферменте имеется большого размера «карман», в который попадает боковая цепь концевого остатка пептидного субстрата.

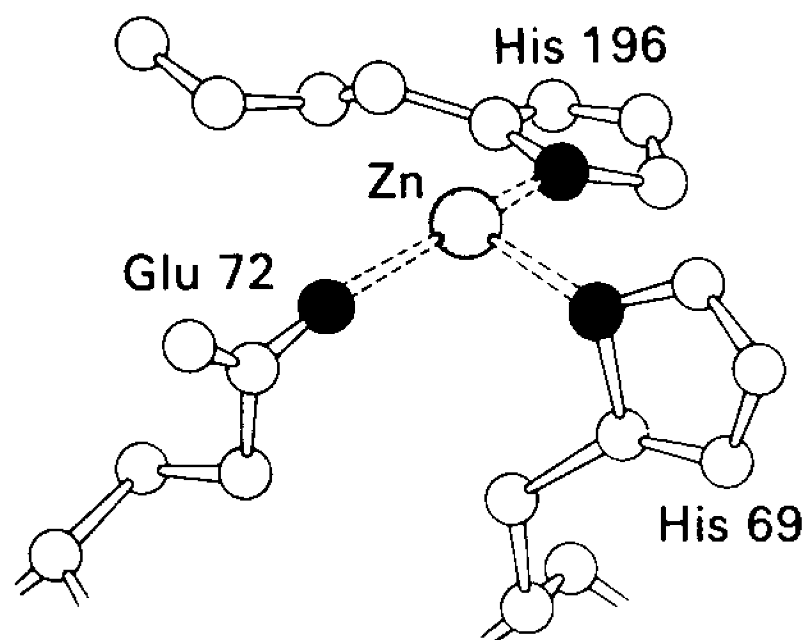


Рис. 7.24. Ион цинка, расположенный в активном центре карбоксипептидазы A, образует координационные связи с боковыми цепями двух гистидинов и глутамата. Занимающая 4-ю координационную связь молекула воды здесь не показана. (Blow D. M., Steitz T. A., X-ray diffraction studies of enzymes, Ann. Rev. Biochem., **39**, 78, Copyright 1970 by Annual Reviews, Inc.)

10–665

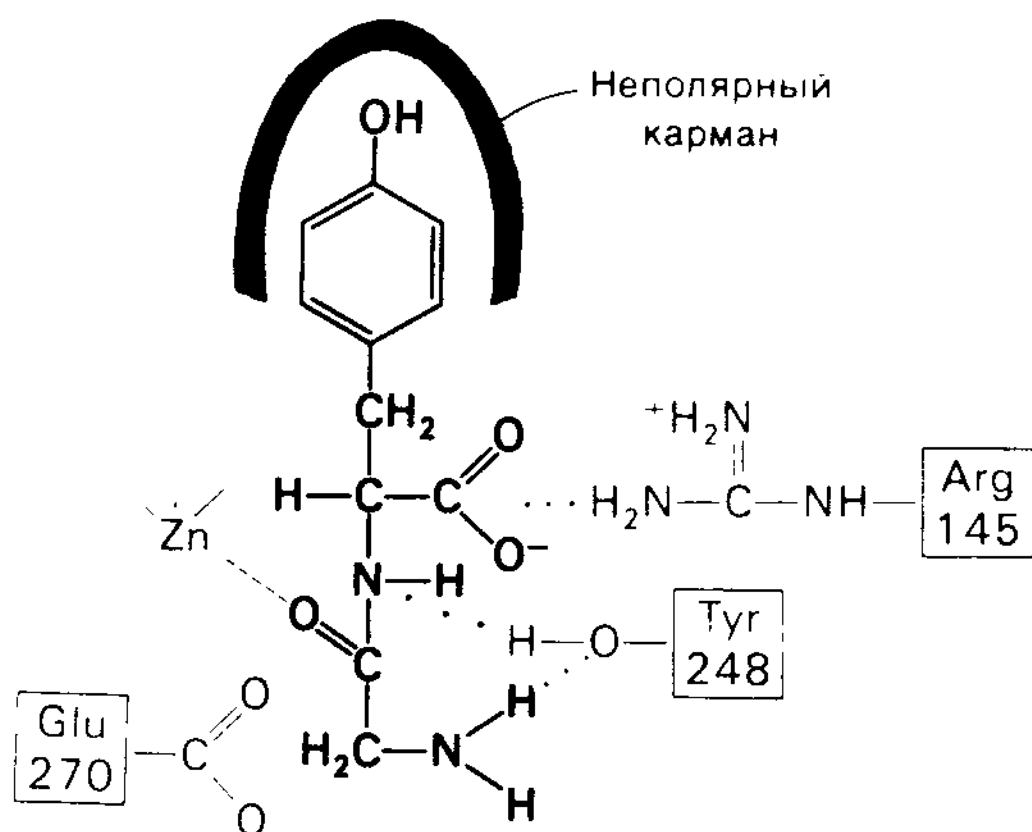


Рис. 7.25. Схематическое изображение связывания глицилтирозина в активном центре карбоксипептидазы А. Показан постулированный каталитически активный комплекс.

7.9. Связывание субстрата индуцирует большие структурные изменения активного центра карбоксипептидазы А

Представление о характере связывания субстратов с карбоксипептидазой А возникло на основе данных, полученных при изучении структуры комплекса этого фермента с глицилтирозином. Глицилтирозин – медленно гидролизуемый субстрат. Процесс его связывания (рис. 7.25 и 7.26) можно представить в виде пяти последовательных этапов.

1. Отрицательно заряженная концевая карбоксильная группа глицилтирозина вступает в электростатическое взаимодействие с положительно заряженной боковой цепью аргинина-145.

2. Субстрат через боковую цепь своего тирозина связывается в неполярном кармане фермента.

3. Водород NH-группы той пептидной связи, которая должна гидролизоваться, соединяется водородной связью с OH-группой ароматической боковой цепи тирозина-248.

4. Карбонильный кислород той же пептидной связи вступает в координационную связь с ионом цинка.

5. Концевая аминогруппа субстрата образует водородную связь через вклинивающуюся молекулу воды с боковой цепью глутамата-270. Это взаимодействие, вероятно, не имеет места в случае реакционноспо-

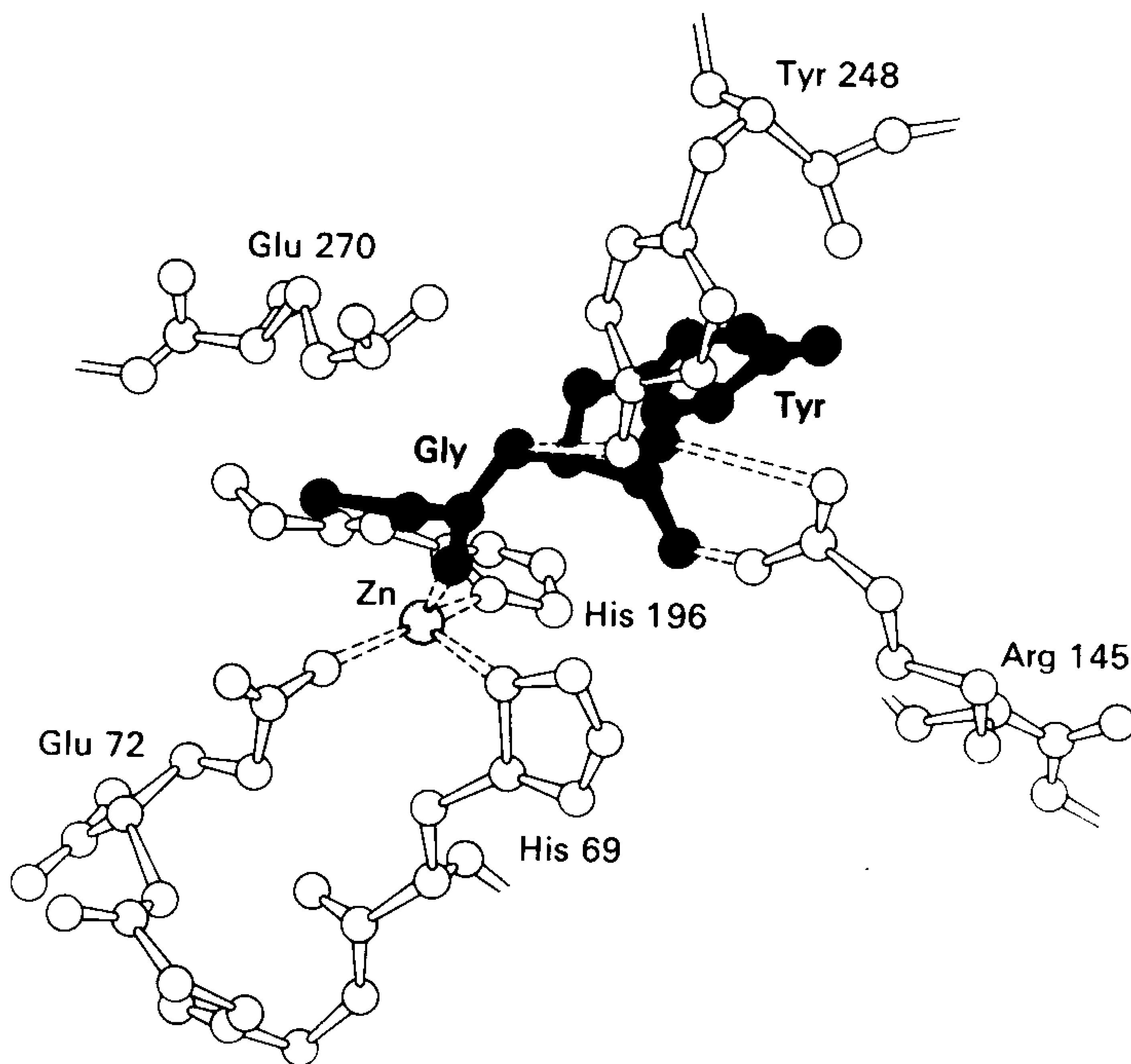


Рис. 7.26. Пространственное расположение глицилтирозина в активном центре карбоксипептидазы А. Глицилтирозин (субстрат) изображен красным. (Blow D. M., Steitz T. A., X-ray diffraction studies of enzymes, Ann. Rev. Biochem., **39**, 78, Copyright 1970.)

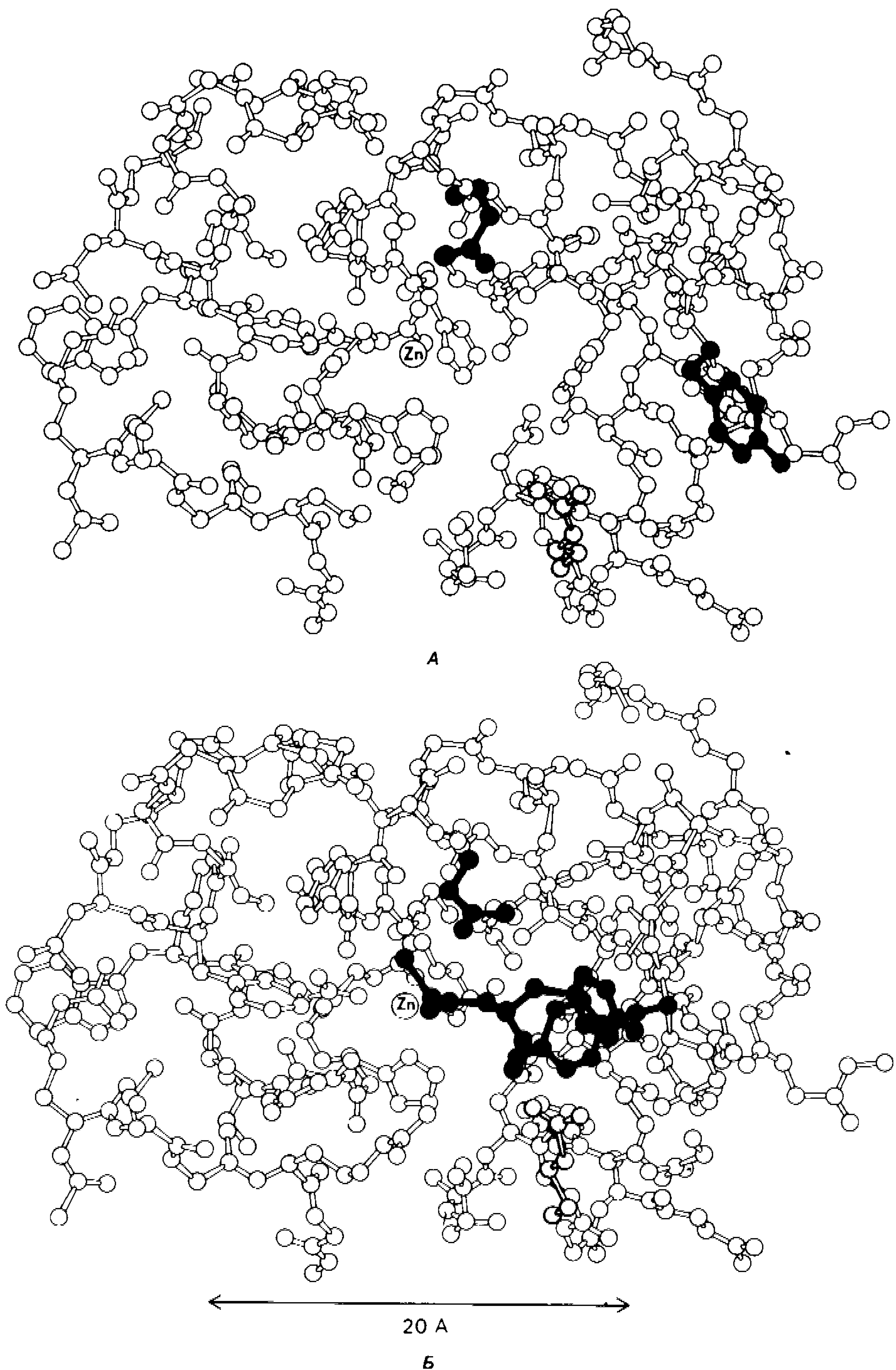


Рис. 7.27. Структура карбоксипептидазы А меняется при связывании субстрата: *А* – фермент без субстрата (Arg 145 показан желтым, Glu 270 – зеленым, Tyr 248 – синим); *Б* – фермент-субстратный комплекс (глицилтирозин, субстрат, изображен красным). На рисунке показана только часть молекулы фермента. [Lipscomb W. N., Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res., **15**, 140–141 (1971).]

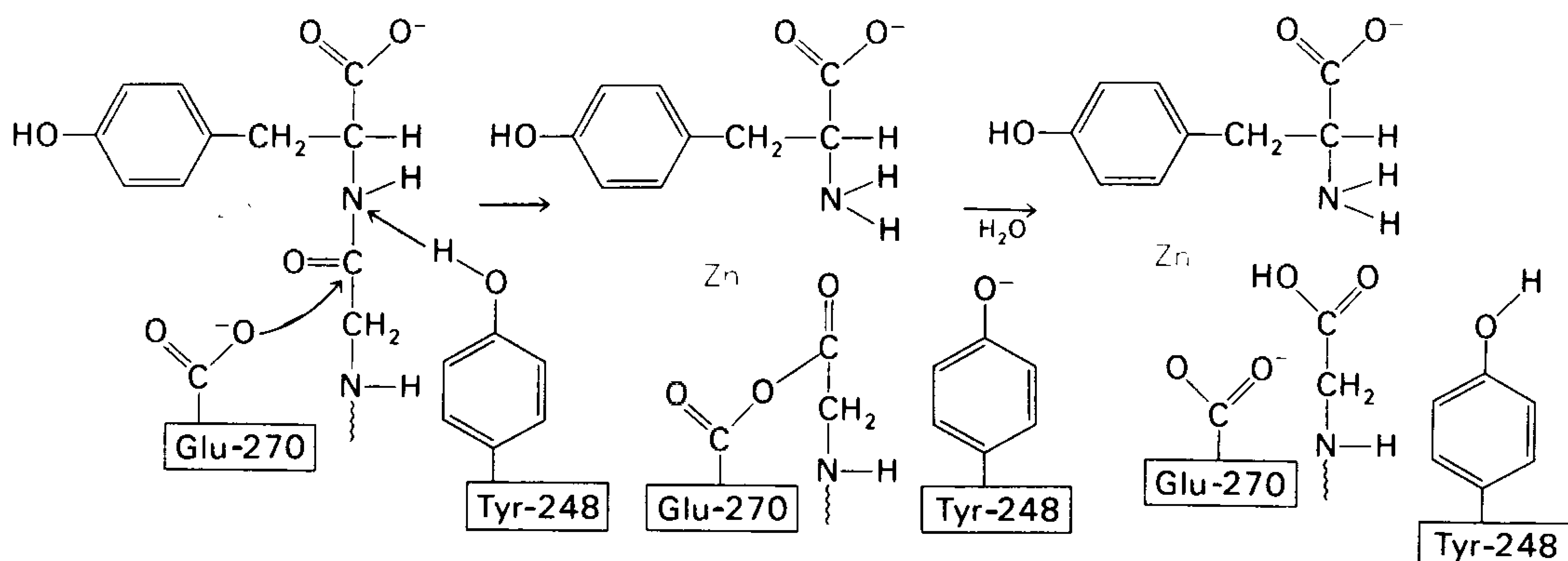


Рис. 7.28. Постулированный механизм каталитического действия карбоксипептидазы А: Glu-270 непосредственно атакует карбонильный углеродный атом гидролизуемой пептидной связи, а Tyr-248 отдает протон на NH-группу этого пептида. Образующийся в результате ангидрид далее подвергается гидролизу.

собного ES-комплекса, и именно оно, возможно, является причиной крайне медленного гидролиза глицилтирозина.

Связывание глицилтирозина сопровождается структурной перестройкой активного центра (рис. 7.27). В сущности, *только присоединив субстрат, каталитические группы фермента принимают правильную ориентацию* – положение, впервые постулированное Кошландом (Koshland) в его *модели индуцированного соответствия.* Гуанидиниевая группа аргинина-145, а также карбоксильная группа глутамата-270 перемещаются на 2 Å. Связывание карбонильной группы субстрата с ионом цинка вытесняет из связи с цинком молекулу воды. По крайней мере еще четыре молекулы воды вытесняются из неполярного кармана на ферменте при связывании с ними тирозиновой боковой цепи в молекуле субстрата. Самое большое изменение конформации – это перемещение фенольного гидроксила тирозина-248 на 12 Å, т. е. на расстояние, составляющее около 1/4 диаметра молекулы. Такое перемещение осуществляется в первую очередь, путем свободного вращения относительно одинарной связи —C—C— и состоит в том, что гидроксильная группа тирозина-248, бывшая на поверхности молекулы, перемещается, оказываясь вблизи пептидной связи субстрата. В результате закрывается полость активного центра и тем самым завершается превращение ее из области, заполненной водой, в гидрофобную. Все эти структурные изменения инициируются, по-видимому, связыванием аргинина-145 с концевой карбоксильной группой субстрата.

7.10. Скорость катализа карбоксипептидазой А возрастает благодаря смещению электронов

На основе данных рентгеноструктурного анализа Липском (Lipscomb) предложил механизм каталитического действия карбоксипептидазы А. Постулированная структура реакционноспособного ES-комплекса показана на рис. 7.28. Согласно предложенному механизму, OH-группа тирозина-248 отдает протон на NH-группу расщепляемой пептидной связи. Карбонильный атом углерода этой пептидной связи подвергается атаке со стороны карбоксильной группы глутамата-270, которая выступает в данном случае как нуклеофильная группа. Образующийся в результате ангидрид глутамата-270 и кислотного компонента субстрата подвергается далее гидролизу.

Возможен и другой механизм катализа, также согласующийся с данными рентгеноструктурного анализа; он показан на рис. 7.29. По этой схеме глутамат-270 активирует молекулу воды. Образующийся OH^- непосредственно атакует карбонильный атом углерода расщепляемой пептидной связи. Одновременно тирозин-248 отдает протон на ее NH-группу, и в итоге пептидная связь гидролизуется. Этот механизм катализа отличается от механизма, приведенного на рис. 7.28, тем, что предполагает гидролиз водой непосредственно пептидной связи субстрата, а не промежу-

точно образующегося ангидрида. Проведенные в последнее время химические и спектроскопические исследования свидетельствуют о том, что гидролиз пептидных субстратов осуществляется по прямому механизму, тогда как гидролиз эфиров протекает через промежуточное образование ангидрида с глутаматом-270.

Какова роль цинка в этих схемах катализа? Карбонильная группа расщепляемой пептидной связи обращена к иону цинка таким образом, что связь C=O оказывается более поляризованной, чем обычно; это делает карбонильный атом углерода более чувствительным к нуклеофильной атаке. Неполярное окружение иона цинка увеличивает его эффективный заряд и тем самым его способность индуцировать диполь. Сильной поляризации карбонильной группы способствует также близость отрицательного заряда глутамата-270. Следовательно, *карбокиспептидаза А индуцирует такое смещение электронов на субстрате, которое повышает скорость катализа.*

Теперь мы можем оценить значение индуцированных субстратом структурных изменений в активном центре карбоксипептидазы А. В результате связавшийся на ферменте субстрат оказывается со всех сторон окруженным каталитическими группами. Это обеспечивает возможность катализа по причинам, о которых говорилось выше. *Совершенно очевидно, что только гибкость структуры фермента обеспечивает попадание субстрата в сферу действия системы каталитических групп (и выход продуктов реакции из этой системы).* В целом гибкая структура фермента имеет преимущество перед жесткой в том отношении, что она обладает гораздо бóльшим выбором возможных конформаций, пригодных для катализа и сохраняющихся в процессе отбора. Кроме того, индуцированное соответствие вносит вклад в повышение специфичности фермента. В самом деле, в случае карбоксипептидазы А субстрат должен иметь концевой карбоксилат-ион; фермент «проверяет» его наличие таким путем: если концевой карбоксилат-ион имеется, то он образует солевую связь с аргинином-145, а это вызывает перемещение тирозина-248 в каталитически активное положение; если же концевого карбоксилат-иона нет, то тирозин-248 остается на месте и фермент не проявляет активности. Другими словами, *индукция соответствия может функционировать как динамический процесс узнавания.*

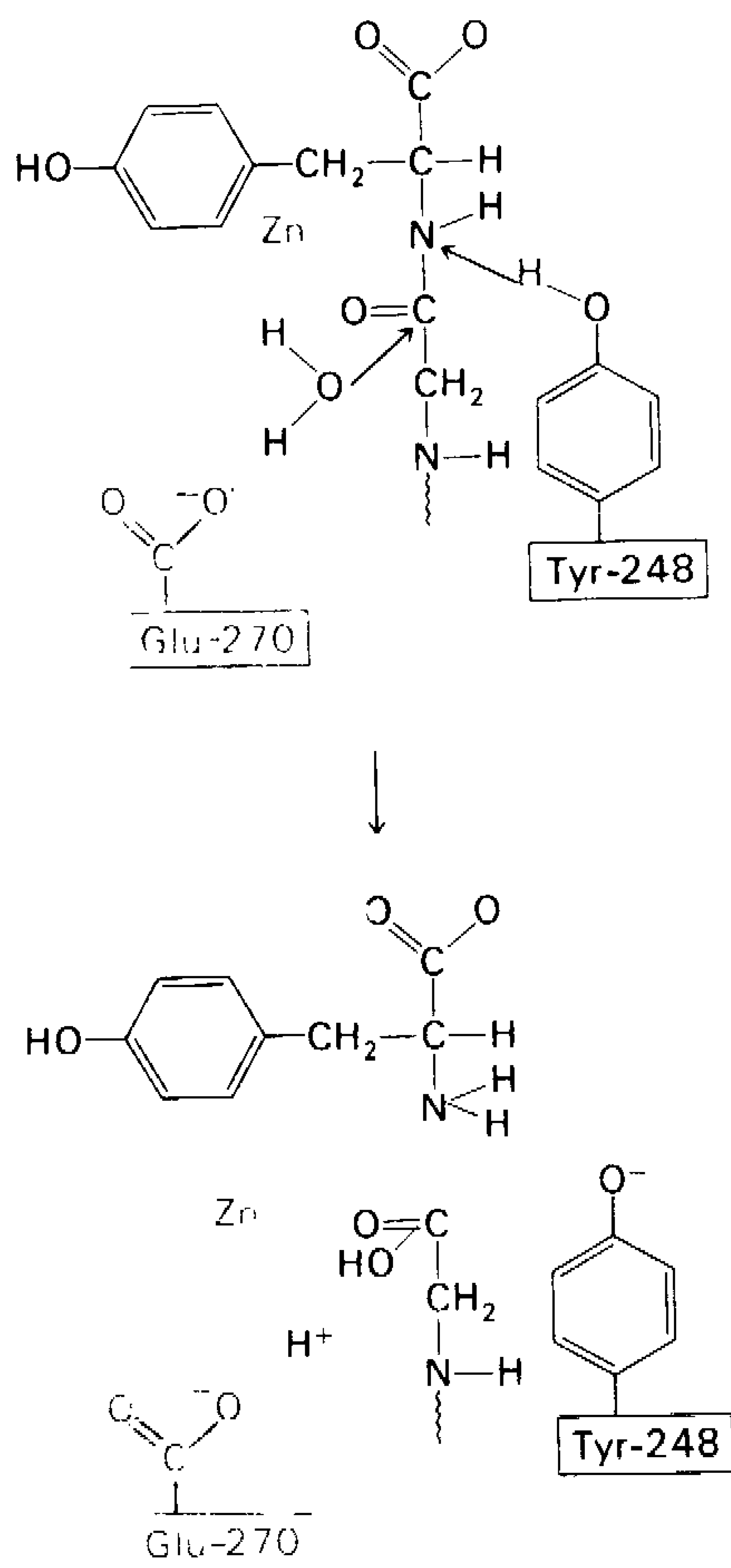


Рис. 7.29. Второй возможный механизм каталитического действия карбоксипептидазы А.
Tyr 248 выполняет ту же функцию, что и на рис. 7.28. В остальном процесс протекает иначе: Glu 270 активирует молекулу воды, которая атакует карбонильный атом углерода расщепляемой пептидной связи. Гидролиз осуществляется прямо, без промежуточного образования ангидрида.

Заключение

Лизоцим – фермент относительно небольшого размера, расщепляющий полисахаридный компонент клеточных стенок бактерий. По своей структуре указанный полисахарид представляет собой чередующийся полимер остатков N-ацетилглюкозамина (NAG) и N-ацетилмурамовой кислоты

(NAM), соединенных гликозидными связями β (1 → 4). Лизоцим гидролизует глизозидную связь между С-1 остатка NAM и С-4 остатка NAG. Олигомеры N-ацетилглюкозамина также гидролизуются лизоцимом. При этом гекса-NAG и более длинные полимеры легко расщепляются ферментом, тогда как три-NAG и ди-NAG гидролизуются с крайне малой скоростью. Три-NAG — сильный конкурентный ингибитор фермента. Трехмерная структура лизоцима и его комплекса с три-NAG изучена на атомарном уровне. Установлено, что три-NAG занимает половину щели, идущей поперек молекулы фермента, с которым он связывается большим количеством водородных связей и вандерваальсовых взаимодействий. На основе данных о структуре комплекса лизоцима с три-NAG была построена модель, предсказывающая, как связывается с лизоцимом его эффективный субстрат гекса-NAG.

Предложена гипотеза механизма каталитического действия лизоцима; суть гипотезы состоит в следующем. Первое: критическими группами для катализа являются неионизированная карбоксильная группа остатка глутамата-35 и карбоксилат-ион аспартата-52. Обе группы расположены на расстоянии около 3 Å от гидролизуемой гликозидной связи, а именно связи между остатками D и E гексамерного субстрата. Второе: глутамат-35 отдает H^+ связи между С-1 кольца D и гликозидным атомом кислорода, что приводит к разрыву этой связи. С-1 кольца D становится положительно заряженным; такая переходная форма называется ионом *карбония*. Третье: ион карбония реагирует с OH^--группой растворителя, а глутамат-35 присоединяет водород, возвращаясь в исходную протонированную форму. После того как продукты реакции удаляются от фермента в результате диффузии, лизоцим готов к новому каталитическому циклу. Четвертое: скорость катализа значительно увеличивается под действием двух факторов, способствующих промежуточному образованию иона карбония: это электростатический фактор, а именно близость отрицательно заряженной боковой цепи аспартата-52 и геометрический фактор, состоящий в том, что кольцо D деформируется, приобретая конформацию полукресла, что приводит к распределению положительного заряда иона карбония между С-1 и атомом кислорода углеводного кольца.

Карбоксипептидаза А, пищеварительный фермент, расщепляющий С-концевой пептид в полипептидах, служит примером фермента, в основе каталитического действия которого лежит совершенно иной механизм. Структура этого фермента и его комплекса с глицилтирозином – аналогом субстрата – раскрыта на уровне атомного разрешения. Связывание глицилтирозина вызывает большие структурные изменения в области активного центра, в результате которых эта область теряет воду и становится гидрофобной. Пример карбоксипептидазы А иллюстрирует ту важную роль, которую играет в катализе *индуцированное соответствие* формы фермента форме субстрата. Другая примечательная особенность данного фермента состоит в том, что в его активном центре содержится ион цинка, имеющий существенное значение для катализа. Карбонильный атом углерода расщепляемой пептидной связи поляризуется цинком и становится более чувствительным к нуклеофильной атаке. Здесь мы видим пример индукции *смещения электронов* в субстрате. При катализе карбоксипептидазой А молекула воды, активированная глутаматом-270, непосредственно атакует карбонильную группу расщепляемой пептидной связи; одновременно тирозин-248 отдает протон на NH-группу этой связи, и в результате происходит гидролиз.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Phillips D. C., 1966. The three-dimensional structure of an enzyme molecule, Sci. Amer., **215** (5), 78–90. (Великолепная статья о трехмерной структуре и механизме каталитического действия лизоцима.)

Lipscomb W. N., 1971. Structures and mechanisms of enzymes, Proc. Robert A. Welsh Found. Conf. Chem. Res., **15**, 131–156. (Прекрасно иллюстрированное детальное обсуждение структуры и механизмов действия карбоксипептидазы А и ряда других ферментов.)

Структура и механизм действия лизоцима

Osserman E. F., Canfield R. E., Beychok S. (eds.), 1974. Lysozyme, Academic Press.

Imoto T., Johnson L. N., North A. C. T., Phillips D. C., Rupley J. A., 1972. Vertebrate lysozymes. In: Boyer P. D.

(ed.), The Enzymes (3rd ed.), vol. 7, pp. 666–868, Academic Press.
Dahlquist F.W., Rand-Meir T., Raftery M.A., 1968. Demonstration of carbonium ion intermediate during lysozyme catalysis, Proc. Nat. Acad. Sci., **61**, 1194–1198.
Rupley J.A., 1967. The binding and cleavage by lysozyme of N-acetylglucosamine oligosaccharides, Proc. Roy. Soc. (B) **167**, 416–428. (Представлены результаты опытов по гидролизу в меченной ^{18}O воде, а также значения G^0 при связывании олигосахаридов и скорости гидролиза лизоцимов.)
Ford L.O., Jonhson L.N., Mackin P.A., Phillips D.C., Tjian R., 1974. Crystal structure of a lysozyme-tetrasaccharide lactone complex, J. Mol. Biol., **88**, 349–371.

Роль напряженности структур при катализе

Pauling L., 1948. Nature of forces between large molecules of biological interest, Nature, **161**, 707–709. (Содержит предвидение о роли напряженности структур в ферментативном катализе.)
Wolfenden R., 1972. Analog approaches to the structure of the transition state in enzyme reactions, Acc. Chem. Res., **5**, 10–18.
Leinhard G.E., 1973. Enzymatic catalysis and transition-state theory, Science, **180**, 149–154.
Secemski I.I., Lienhard G.E., 1971. The role of strain in catalysis by lysozyme, J. Amer. Chem. Soc., **93**, 3549–3550.
Schindler M., Sharon N., 1976. A transition state analog of lysozyme catalysis prepared from the bacterial cell wall tetrasaccharide, J. Biol. Chem., **251**, 4330–4335.
Warshel A., Levitt M., 1976. Theoretical studies of enzymatic reactions: dielectric, electrostatic, and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme, J. Mol. Biol., **103**, 227–249. (Приведены расчеты, показывающие, что электростатические факторы в большей мере способствуют образованию иона карбония в молекуле лизоцима, чем стерические.)

Структура и механизм действия карбоксипептидазы А

Quiocho F.A., Lipscomb W.N., 1971. Carboxypeptidase A: a protein and an enzyme, Advan. Protein Chem., **25**, 1–78. (Обзор данных рентгеноструктурного исследования этого фермента. Даны атомные координаты.)
Makinen M.W., Yamamura K., Kaiser E.T., 1976. Mechanism of action of carboxypeptidase in ester hydrolysis, Proc. Nat. Acad. Sci., **73**, 3882–3886. (Представлены доказательства образования ковалентного промежуточного продукта ацетил-фермент при гидролизе эфиров.)
Breslow R., Wernick D.L., 1977. Unified picture of mechanisms of catalysis by carboxypeptidase A, Proc. Nat. Acad. Sci., **74**, 1303–1307. (Приведены данные о прямом гидролизе пептидных субстратов и высказано предположение о различии механизмов гидролиза эфиров и пептидов.)

Вопросы и задачи

1. Предскажите относительную скорость гидролиза лизоцимом следующих олигосахаридов (буквой G обозначен остаток N-ацетилглюкозамина, буквой M – остаток N-ацетилмурамовой кислоты):
а) M-M-M-M-M-M
б) G-M-G-M-G-M
в) M-G-M-G-M-G

2. На основании данных, приведенных на рис. 7.18, предскажите, какие из участков связывания углеводов на лизоциме (от A до F) окажутся занятыми при образовании фермент-субстратного комплекса со следующими олигосахаридами (сокращения те же, что и в задаче 1):
а) G-G
б) G-M
в) G-G-G-G

3. Предположим, что при синтезе гекса-NAG гликозидный кислород между остатками сахаров D и E мечен изотопом ^{18}O. Где окажется этот изотоп после гидролиза гекса-NAG лизоцимом?

4. Аналог тетра-NAG, содержащий —H вместо —CH_2OH при C-5 в остатке D значительно сильнее связывается с лизоцимом, чем тетра-NAG. Объясните, какие особенности структуры лежат в основе этой разницы в сродстве связывания.

5. Сопоставьте координационные связи атома цинка в карбоксипептидазе A и атома железа в оксимиоглобине и оксигемоглобине.
а) Какие атомы непосредственно связаны с этими металлами?
б) Каким боковым цепям принадлежат связанные с металлом группы?
в) Какие другие боковые цепи в белках способны связываться с металлом?

6. Экспериментальные данные в пользу прямого гидролиза (рис. 7.29) пептидов карбоксипептидазой A были получены в опытах по изотопному обмену с ^{18}O. N-бензоилглицин, меченный ^{18}O по карбоксильной группе, инкубировали с карбоксипептидазой A. В присутствии L-фенилаланина ^{18}O включался в H_2O. Этого не наблюдалось, если вместо фенилаланина в инкубационную смесь добавляли L-β-фенилмолочную кислоту. Предложите наиболее простую интерпретацию этого эффекта.

ГЛАВА 8.
Активация проферментов: пищеварительные ферменты и факторы свертывания крови

Ферментативно активная форма лизоцима возникает в результате спонтанного складывания молекулы с образованием характерной для этого фермента трехмерной структуры. В отличие от лизоцима многие другие белки синтезируются в форме неактивных предшественников, которые затем активируются в результате расщепления одной или нескольких специфических пептидных связей. Если каталитически активный белок называется ферментом (или энзимом), то неактивный предшественник фермента называется *проферментом* (или *зимогеном*).

Активация белков путем специфического протеолиза – процесс, широко распространенный в биологических системах. Приведем несколько примеров.

1. *Пищеварительные ферменты*, гидролизующие белки, синтезируются в желудке и поджелудочной железе в виде проферментов (табл. 8.1).

2. *Свертывание крови* опосредовано каскадом реакций протеолитической активации, обеспечивающим быстрый и нарастающий по силе ответ на травму.

3. Некоторые белковые гормоны синтезируются в виде неактивных предшественников. Например, *инсулин* образуется из *проинсулина* в результате протеолитического удаления пептида.

4. *Фибриллярный белок коллаген*, содержащийся в большом количестве в коже и костях, образуется из растворимого предшественника – *проколлагена*.

8.1. Активация химотрипсиногена происходит путем специфического расщепления одной пептидной связи

Химотрипсин – это пищеварительный фермент, гидролизующий белки в тонком кишечнике. Как и ряд других проферментов и пищеварительных ферментов, он синтезируется в поджелудочной железе в форме неактивного предшественника – *химотрипсиногена*. Вообще поджелудочная железа – это один из органов, наиболее активно синтезирующих белки. Ферменты и их предшественники синтезируются в ацинарных клетках поджелудочной железы (рис. 8.1). Внутри этих клеток новосинтезированные белки транспортируются из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи, где окружаются белково-липидной мембраной; так образуются *зимогеновые гранулы*, которые в электронном микроскопе выглядят как очень плотное тельца. Высокая электронная плотность зимогеновых гранул обусловлена содержанием большого количества белка (рис. 8.2). Зимогеновые гранулы накапливаются в верхушке ацинарных клеток и затем под действием гормонального или

Таблица 8.1. **Проферменты, синтезируемые в желудке и поджелудочной железе**

Место синтеза	Профермент (зимоген)	Активный фермент
Желудок	Пепсиноген	Пепсин
Поджелудочная железа	Химотрипсиноген	Химотрипсин
Поджелудочная железа	Трипсиноген	Трипсин
Поджелудочная железа	Прокарбоксипептидаза	Карбоксипептидаза
Поджелудочная железа	Проэластаза	Эластаза

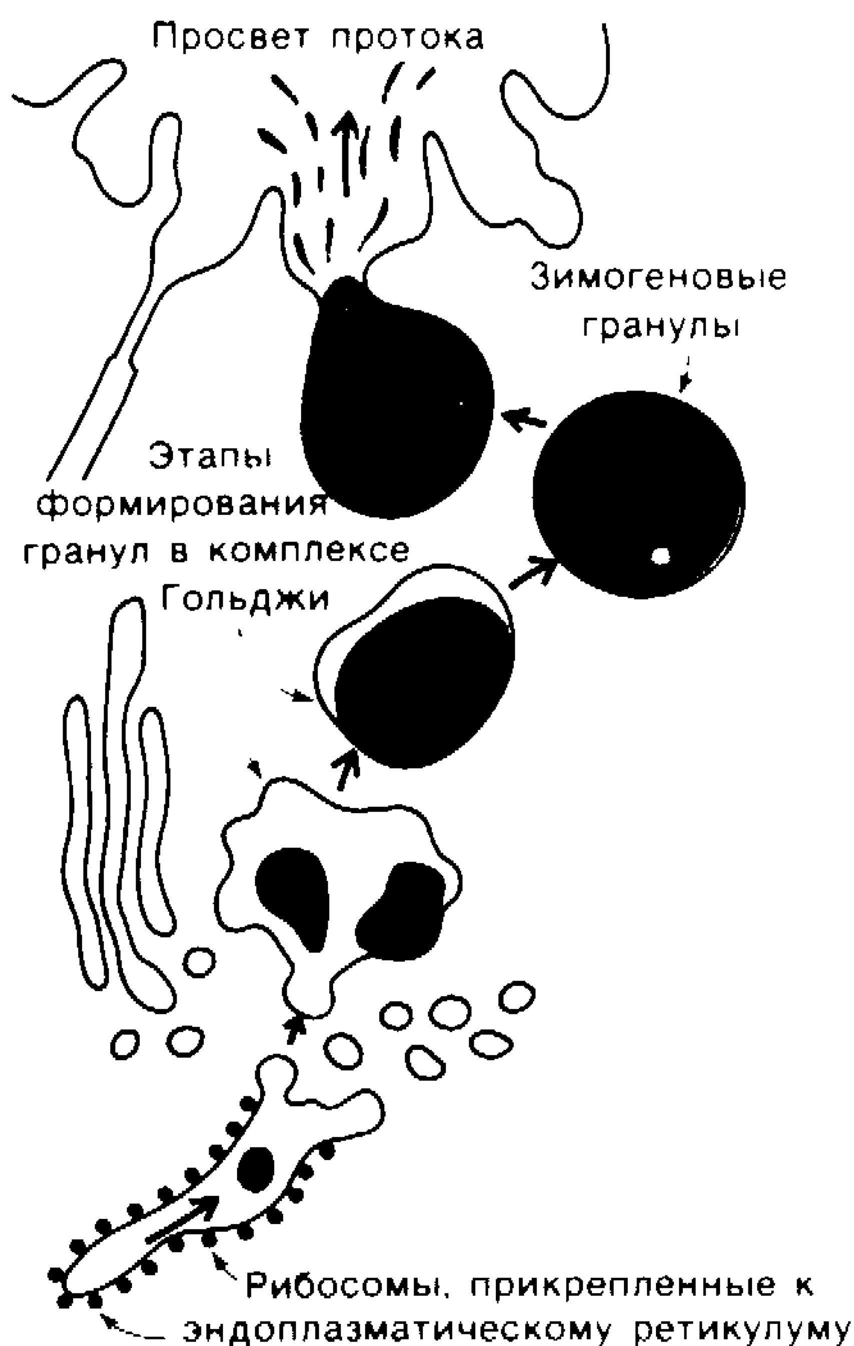


Рис. 8.1. Схематическое изображение секреции проферментов (зимогенов) ацинарной клеткой поджелудочной железы. (По рисунку, любезно предоставленному д-ром G. Palade.)

нервного сигнала секретируются в проток, ведущий в двенадцатиперстную кишку.

Химотрипсиноген образован одной полипептидной цепью, состоящей из 245 аминокислот. Цепь связана пятью дисульфидными мостиками. Химотрипсиноген практически полностью лишен ферментативной активности. Однако он превращается в активный фермент, когда под действием трипсина расщепляется пептидная связь между аргинином-15 и изолейцином-16 (рис. 8.3). Образующийся активный фермент, называемый π-химотрипсином, действует затем на другие молекулы π-химотрипсина. В результате удаления еще двух пептидов образуется стабильная форма фермента – α-химотрипсин. Дополнительное расщепление при превращении π-химотрипсина в α-форму в сущности излишне, поскольку π-химотрипсин сам обладает полной ферментативной активностью. Поразительная особенность данного процесса активации состоит в том, что *расщепление всего лишь одной специфической пептидной связи превращает белок из каталитически неактивной формы в полностью активную.*

8.2. Трехмерная структура химотрипсина

Понять суть этого удивительного процесса активации можно, лишь зная в деталях структуру и механизм каталитического действия химотрипсина. К счастью, фермент этот исследован достаточно хорошо методами химического и рентгеноструктурного анализа. По существу химотрипсин – это один из самых изученных ферментов, и поэтому имеет смысл рассмотреть его более детально.

Молекула химотрипсина состоит из трех полипептидных цепей, соединенных двумя межцепочечными дисульфидными связями (рис. 8.4). Масса фермента составляет около

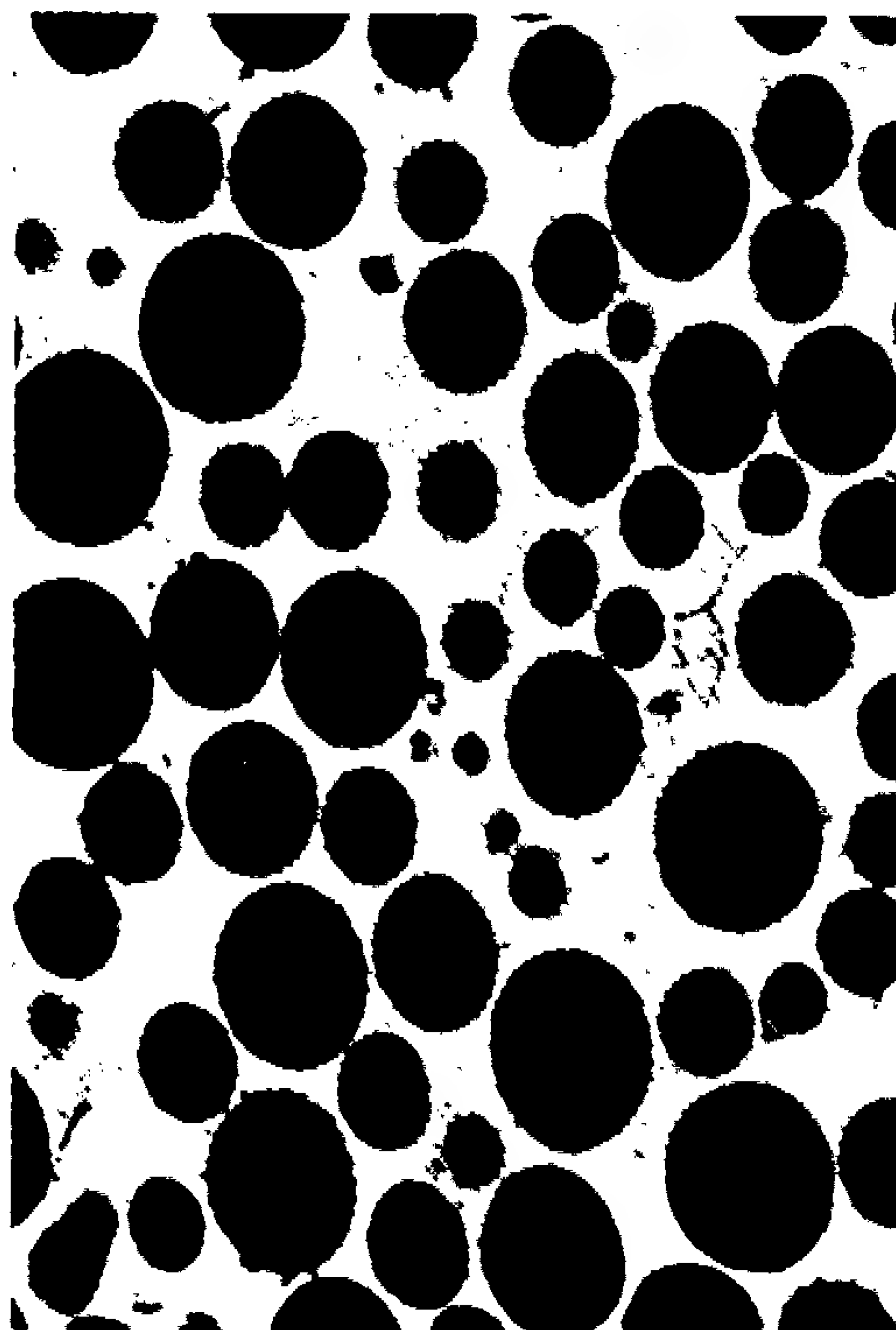


Рис. 8.2. Электронная микрофотография зимогеновых гранул в ацинарных клетках поджелудочной железы. (Печатается с любезного разрешения д-ра G. Palade.)

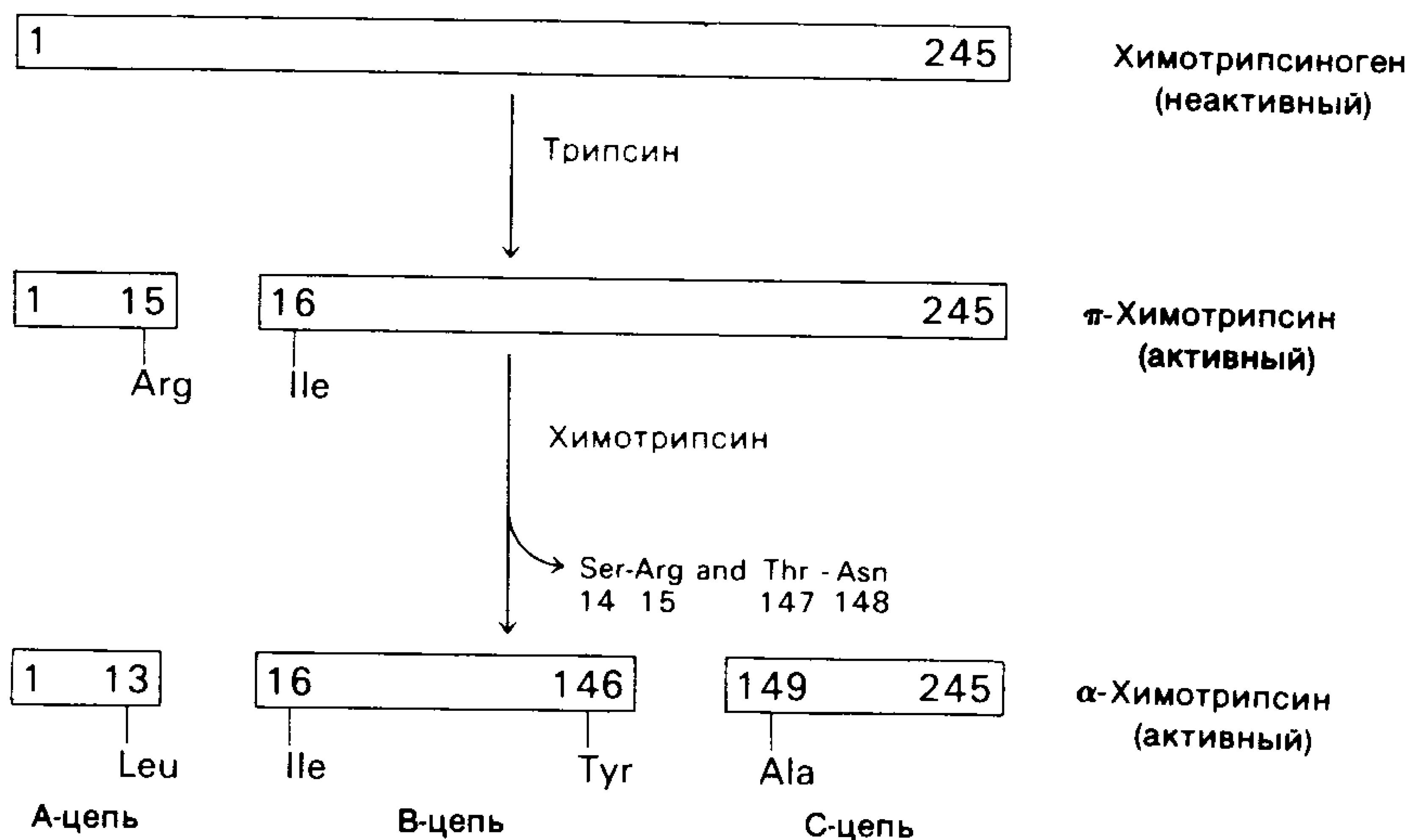


Рис. 8.3. Активация химотрипсиногена.

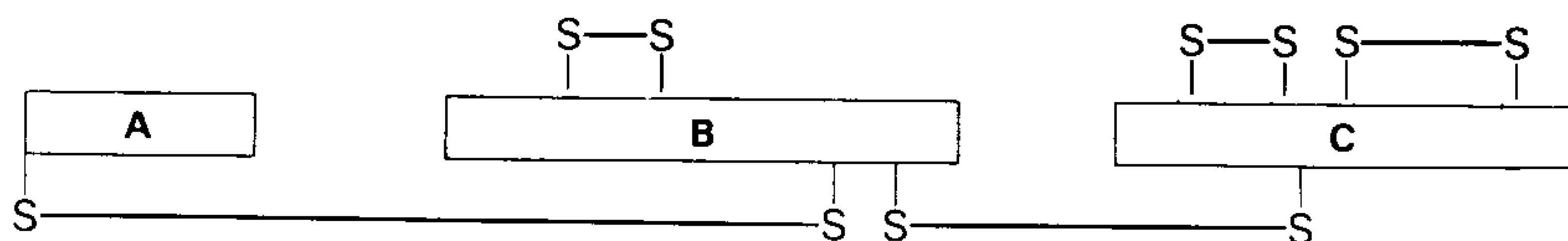


Рис. 8.4. В молекуле α-химотрипсина имеются два межцепочечных дисульфидных мостика и три внутрицепочечные дисульфидные связи.

25 кДа. Трехмерную структуру фермента при разрешении 2 Å (рис. 8.5) установили Дэвид Блоу (D. Blow) и сотрудники методом рентгеноструктурной кристаллографии. Молекула химотрипсина имеет компактную эллипсоидную форму размером 51 × 40 × 40 Å. Все заряженные группы, за исключением трех, абсолютно необходимых для катализа, находятся на поверхности молекулы. Молекула свернута очень сложно; в отличие от миоглобина и гемоглобина она содержит очень мало α-спиралей. Полипептидные цепи в основном вытянуты и нередко идут параллельными тяжами на расстоянии друг от друга примерно 5 Å. Между пептидными группами в прилегающих тяжах образуются многочисленные водородные связи. Часть молекулы обладает вторичной структурой, напоминающей антипараллельные складчатые слои, как это наблюдалось и в лизоциме.

8.3. Химотрипсин специфичен в отношении ароматических и больших неполярных боковых цепей

Биологическая роль химотрипсина – гидролизовать белки в тонком кишечнике (рис. 8.6). Равновесие этой реакции сдвинуто почти полностью в сторону гидролиза (> 99%). Однако химотрипсин способен гидролизовать с высокой скоростью далеко не всякую пептидную связь. Он действует избирательно на пептидные связи, образованные *карбоксильными группами* аминокислот с *ароматическими боковыми цепями* – тирозина, триптофана и фенилаланина, а также аминокислот с *гидрофобными остатками* большого размера, например *метионина* (рис. 8.7).

Химотрипсин гидролизует также *эфирные связи.* Хотя эта реакция не имеет существенного физиологического значения, она представляет интерес в том отношении, что имеет много общего с гидролизом пептидной связи (рис. 8.6). По существу, значительная часть сведений о механизме каталитического действия химотрипсина была получена при изучении гидролиза простых эфиров.

8.4. При катализе химотрипсином часть субстрата ковалентно связывается с ферментом

Химотрипсин катализирует гидролиз пептидных и эфирных связей в два отдельных



Рис. 8.5. Трехмерная структура α-химотрипсина. Показаны только α-углеродные атомы. Цветом отмечены участвующие в катализе остатки. (Blow D. M. In: The Enzymes, P. D. Boyer, ed., 3rd ed., v. 3, Acad. Press, 1971, p. 194)

этапа. Впервые это было обнаружено при изучении кинетики гидролиза *п*-нитрифенилацетата. При использовании больших количеств фермента можно отчетливо проследить наличие двух фаз в высвобождении одного из продуктов реакции – *п*-нитрофенола (рис. 8.8). Сначала наблюдается *быстрое взрывообразное* высвобождение *п*-нитрофенола, после чего он образуется уже с *меньшей стационарной скоростью.*

На первом этапе *п*-нитрофенилацетат присоединяется к химотрипсину, т. е. образуется фермент-субстратный (ES) комплекс (рис. 8.9). Эфирная связь в субстрате при этом расщепляется. Один из продуктов реакции – *п*-нитрофенол – высвобождается, тогда как ацетильная группа субстрата становится ковалентно связанной с ферментом. Далее вода атакует ацетил-ферментный комплекс с образованием ацетат-иона и регенерированного фермента (рис. 8.10). Начальная быстрая фаза высвобождения *п*-нитрофенола соответствует этапу образования ацетил-ферментного комплекса. Этот этап называется *ацилированием.* Более медленное стационарное образование *п*-нитрофенола соответствует этапу гидролиза ацетил-ферментного комплекса и регенерации свободного фермента. Этот второй этап, называемый *деацилированием*, лимитирует скорость всего процесса гидролиза эфиров химотрипсином. Более того, ацетил-ферментный комплекс настолько стабилен, что при благоприятных условиях его удается выделить. Механизм катализа химотрипси-

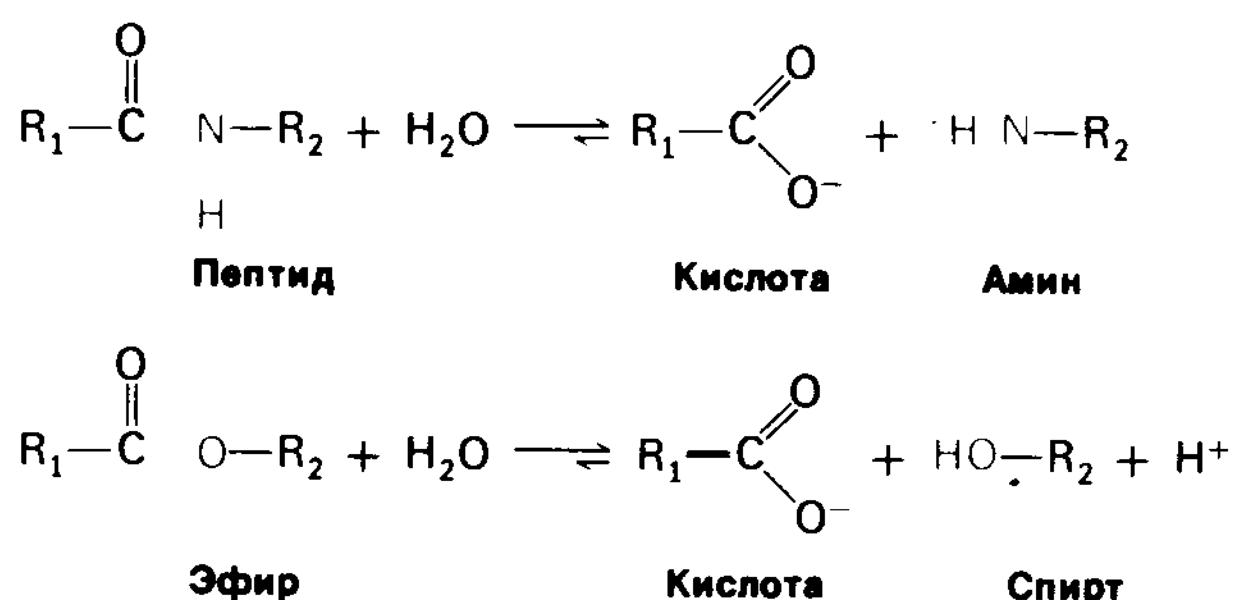
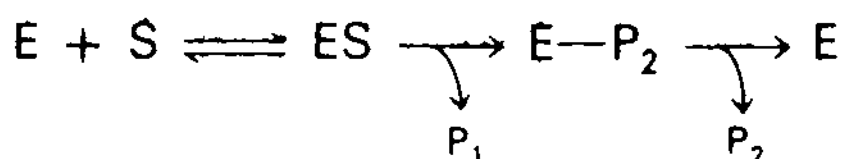


Рис. 8.6. Химотрипсин катализирует гидролиз пептидных и эфирных связей.

ном можно представить в виде следующей схемы:



где P_1 – аминный (или спиртовой) компонент субстрата, $E-P_2$ – промежуточный продукт, образованный в результате ковалентного связывания, P_2 – кислотный компонент субстрата.

Особенность этого механизма реакции состоит в образовании промежуточного продукта путем ковалентного связывания; в рассмотренном выше случае происходило ковалентное соединение ацетильной группы с ферментом. В общем случае группа, присоединенная к химотрипсину на стадии $E-P_2$, – это всегда ацильная группа. Таким образом, E_2-P представляет собой *промежуточное соединение ацил-фермент.*

8.5. Ацильная группа соединяется с необычайно реакционноспособным остатком серина на ферменте

Место, в котором происходит присоединение ацильной группы к ферменту, удалось определить, когда был выделен в чистом виде промежуточный продукт $E-P_2$, стабильный при pH 3. Оказалось, что ацильная группа присоединяется к атому кислорода специфического остатка серина, а именно серина-195. Этот остаток серина проявляет необычно высокую реакционную способность. Его можно специфически пометить каким-либо *органическим фторфосфатом*,

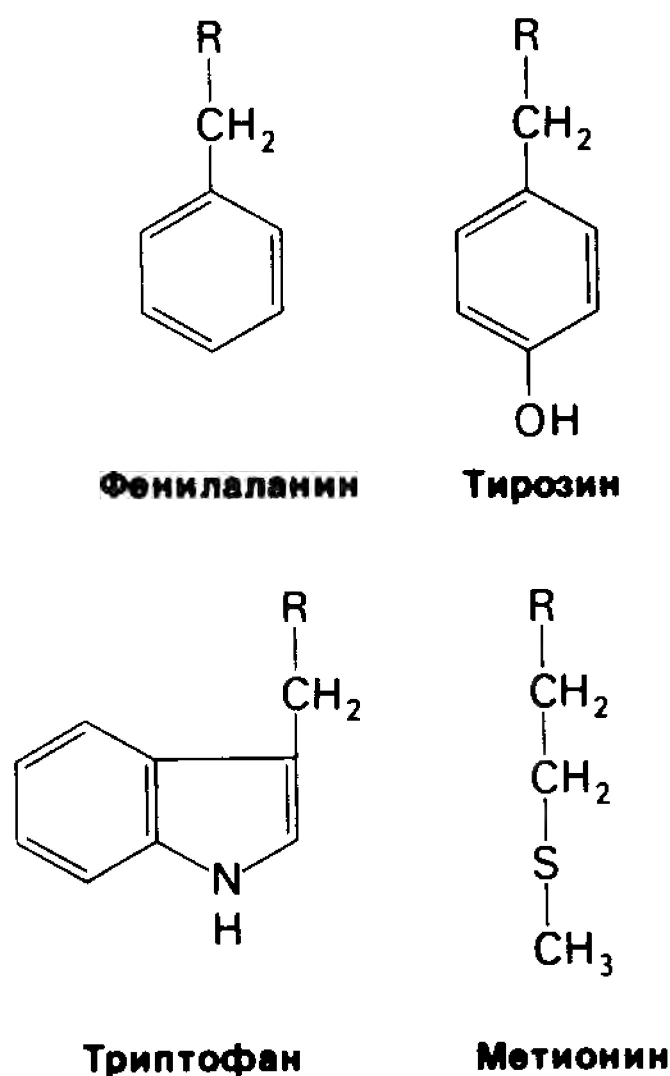


Рис. 8.7. Химотрипсин гидролизует предпочтительно пептидные связи, образованные карбоксильными группами ароматических аминокислот, а также аминокислот с большой неполярной боковой цепью.

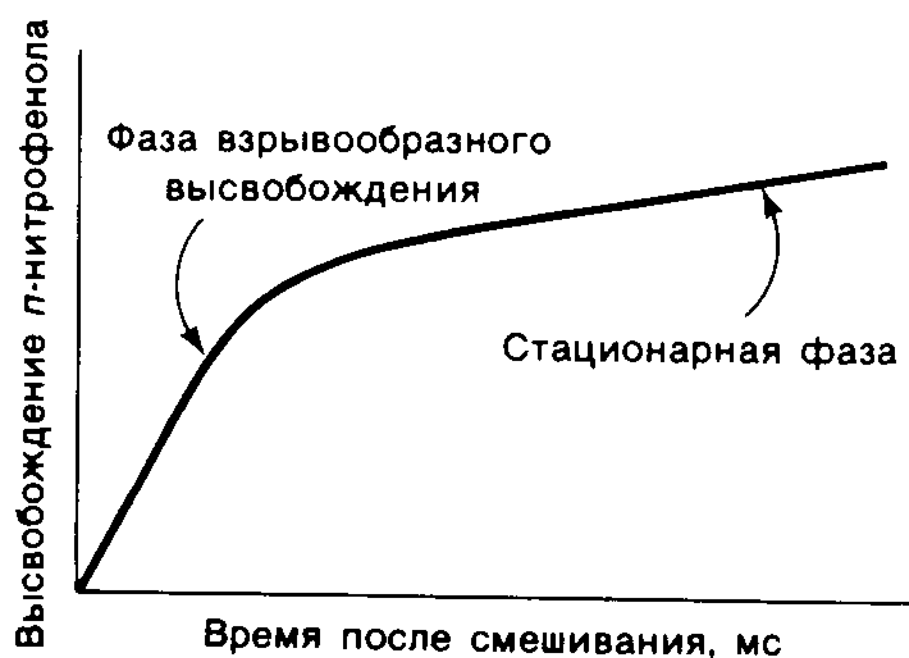


Рис. 8.8. После смешивания химотрипсина и *п*-нитрофенилацетата можно наблюдать две фазы образования *п*-нитрофенола.

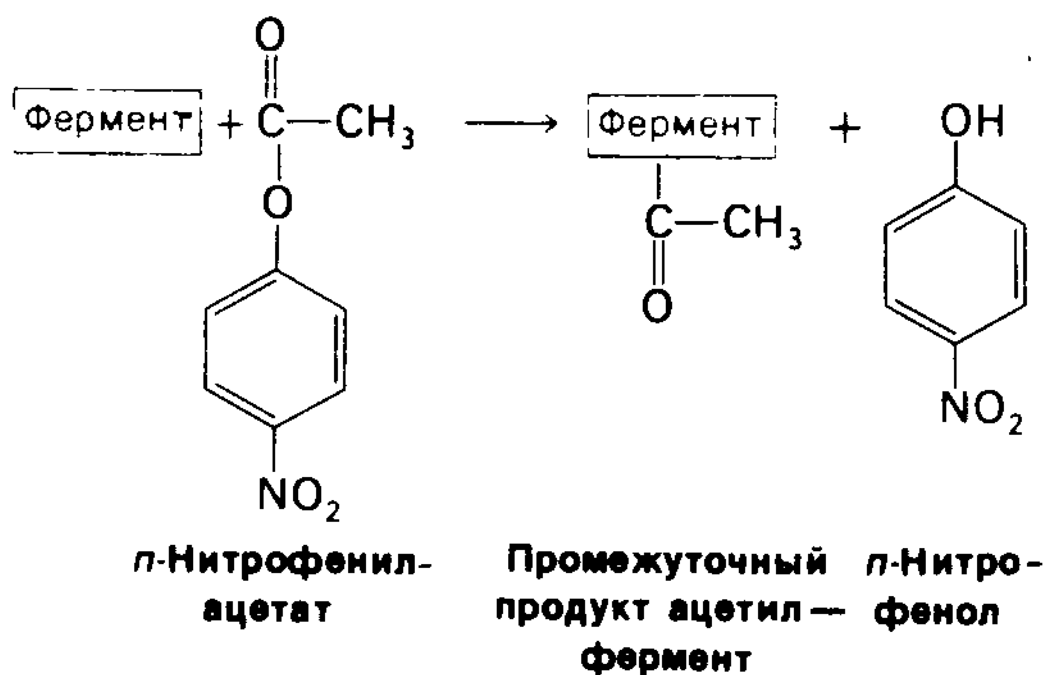


Рис. 8.9. Ацилирование: образование комплекса ацетил-фермент в качестве промежуточного продукта.

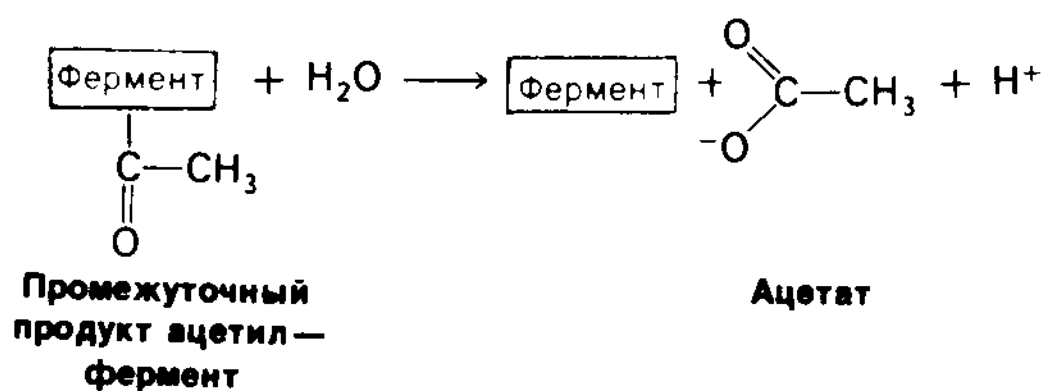


Рис. 8.10. Деацилирование: гидролиз промежуточно образующегося комплекса ацетил-фермент.

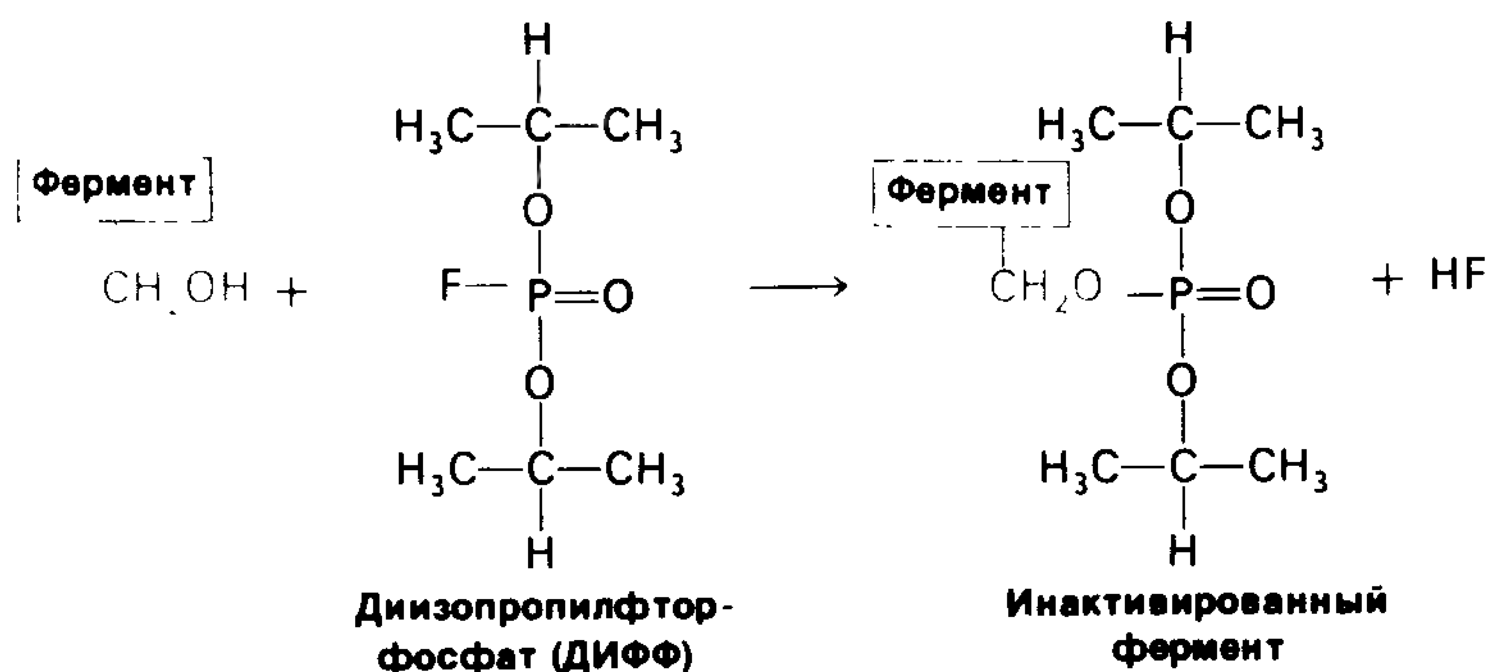
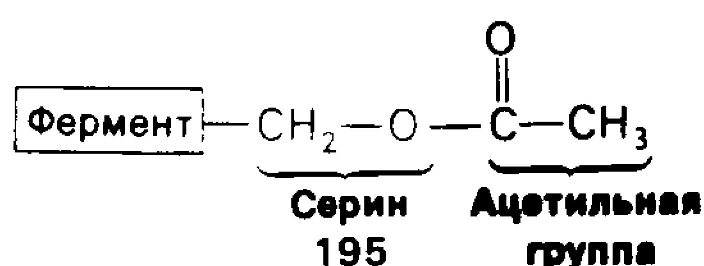


Рис. 8.11. Диизопропилфторфосфат (ДИФФ) инактивирует химотрипсин путем образования диизопропилфосфорильного производного серина-195.

например диизопропилфторфосфатом (ДИФФ), который взаимодействует только с серином-195, давая неактивный высокостабильный *комплекс диизопропилфосфорил-фермент* (рис. 8.11). О повышенной реакционной способности серина-195 отчетливо свидетельствует тот факт, что остальные 27 остатков серина в химотрипсине не взаимодействуют с ДИФФ.



Химотрипсин - не единственный фермент, инактивирующийся в присутствии ДИФФ. Множество других протеолитических ферментов, например трипсин, эластаза, тромбин, субтилизин, специфически реагируют с ДИФФ, полностью теряя при этом активность. Как и в случае химотрипсина, реакция этих ферментов с ДИФФ идет только по одному остатку серина. Отсюда и их общее название - *сериновые протеиназы.* ДИФФ вступает также в реакцию с остатком серина в *ацетилхолинэстеразе* - ферменте, играющем ключевую роль в передаче нервных импульсов в определенных синапсах. Как уже упоминалось в гл. 6, способность ДИФФ инактивировать ацетилхолинэстеразу лежит в основе его использования в *инсектицидах* и *нервно-паралитических газах.*

8.6. Участие гистидина-57 в катализе выявляется с помощью аффинной метки

Участие в катализе второго аминокислотного остатка было установлено путем использования так называемой *аффинной метки,* или *метки по сродству.* Метод заключается в том, что к химотрипсину добавляют вещество, которое 1) специфически связывается в активном центре в силу подобия с субстратом и затем 2) образует стабильную ковалентную связь с некоторой группой, расположенной на ферменте поблизости. Таким веществом является тозил-L-фенилаланинхлорметилкетон (ТФХК), строение которого показано на рис. 8.12. Наличие боковой цепи фенилаланина в ТФХК обеспечивает его специфическое связывание с химотрипсином. Реактивная группа ТФХК - это хлорметилкетон. ТФХК атакует химотрипсин только по гистидину-57, алкилируя один из атомов азота гистидинового кольца (рис. 8.13). ТФХК-производное химотрипсина лишено ферментативной активности. Имеется три довода в пользу присутствия гистидина-57 в активном центре фермента. Во-первых, аффинная метка в высокой степени стереоспецифична: D-изомер ТФХК абсолютно неэффективен. Во-вторых, присутствие конкурентного ингибитора трипсина - β-фенилпропионата - тормозит реакцию с ТФХК.

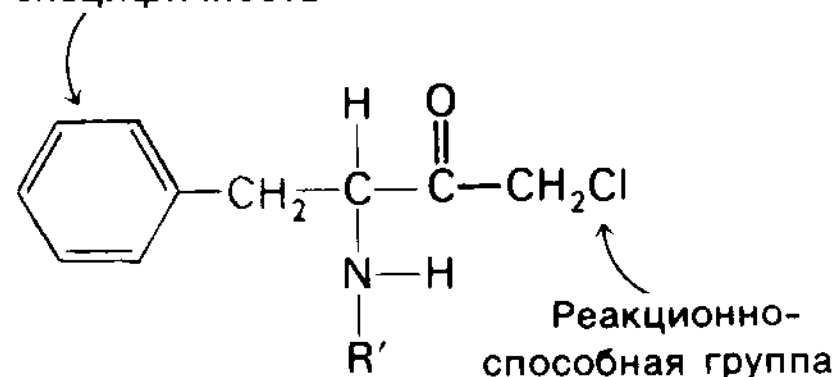


Рис. 8.12. Структура тозил-L-фенилаланинхлорметилкетона (ТФХК), используемого в качестве аффинной метки химотрипсина (R' - тозильная группа).

В-третьих, скорость инактивации химотрипсина при добавлении ТФХК находится примерно в такой же зависимости от pH, как скорость катализа.

8.7. Система переноса заряда обеспечивает челночную передачу протона при катализе

Каталитическая активность химотрипсина определяется необычайно высокой реакционноспособностью серина-195. В физиологических условиях $—CH_2OH$-группа обычно инертна. Почему же в активном центре химотрипсина ее реакционная способность столь резко возрастает? Объяснить это можно, исходя из результатов рентгеноструктурного исследования трехмерной структуры фермента. Как и можно было предположить еще на основе результатов введения аффинной метки, гистидин-57 расположен в непосредственной близости от серина-195. Рядом находится также карбоксильная группа боковой цепи аспартата-102 (рис. 8.14).

По существу каталитическая способность химотрипсина обусловлена взаимодействием этих трех остатков. Аспартат-102 образует водородную связь с гистидином-57, который в свою очередь соединен водородной связью с серином-195. Эти три остатка создают *систему переноса заряда*. Как показано в разд. 8.9, эта система играет ключевую роль в катализе благодаря способности связывать протон (рис. 8.15). Погруженный в молекулу карбоксилат-ион аспартата-102 поляризует имидазольную группу гистидина-57, что повышает его способность осуществлять *челночную передачу протона*. При этом аспартат-102 и гистидин-57 расположены так, что во время нуклеофильной атаки субстрата кислородом они акцептируют протон гидроксильной группы серина-195.

8.8. В химотрипсине имеется глубокий карман для связывания ароматической боковой цепи

Локализация участков специфического связывания и вероятная ориентация гидролизуемой пептидной связи эффективного субстрата были выявлены в результате рентгеноструктурного анализа комплексов химотрипсина с аналогами субстрата. Установлено, что формил-L-триптофан связывается с химотрипсином через индоль-

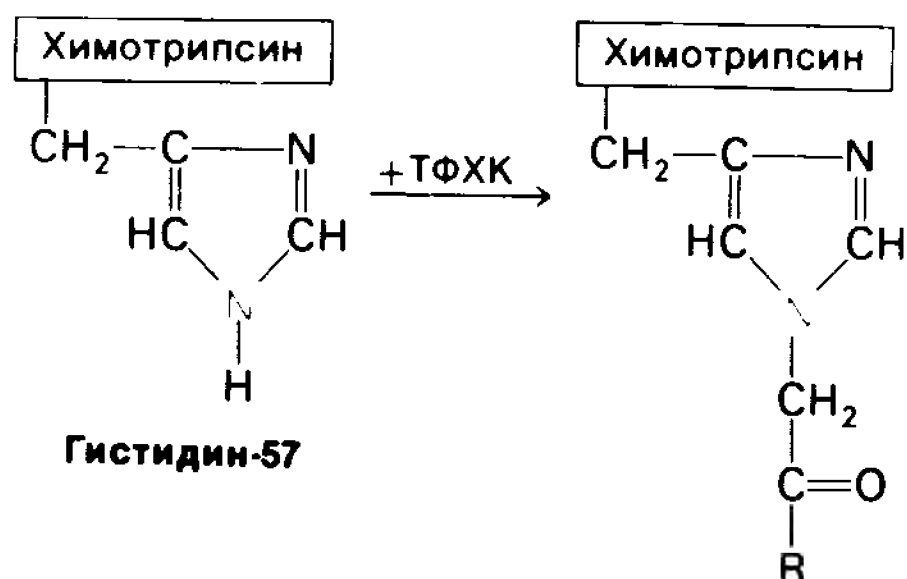


Рис. 8.13. Алкилирование гистидина-57 в химотрипсине воздействием ТФХК.

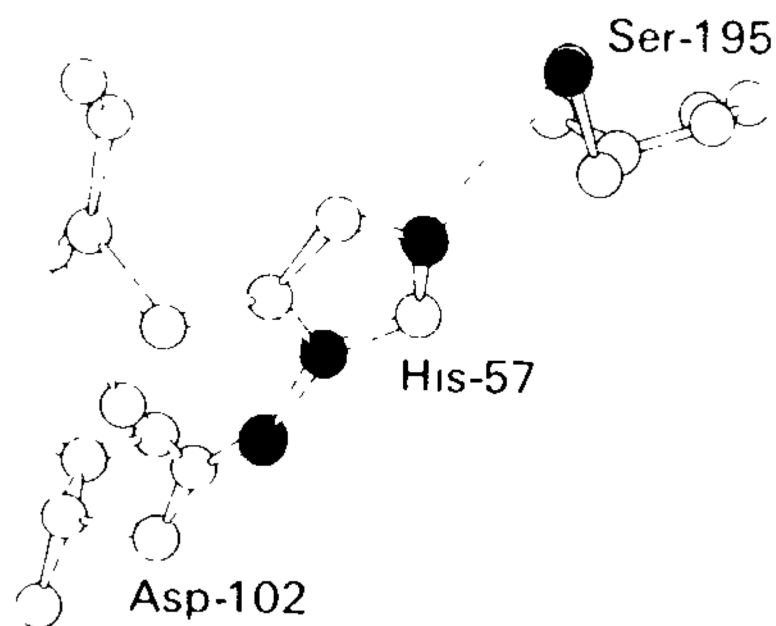


Рис. 8.14. Конформация системы переноса заряда в химотрипсине. [Blow D. M., Steitz T. A., X-ray diffraction studies of enzymes, Ann. Rev. Biochem., **39**, 86 (1976).]

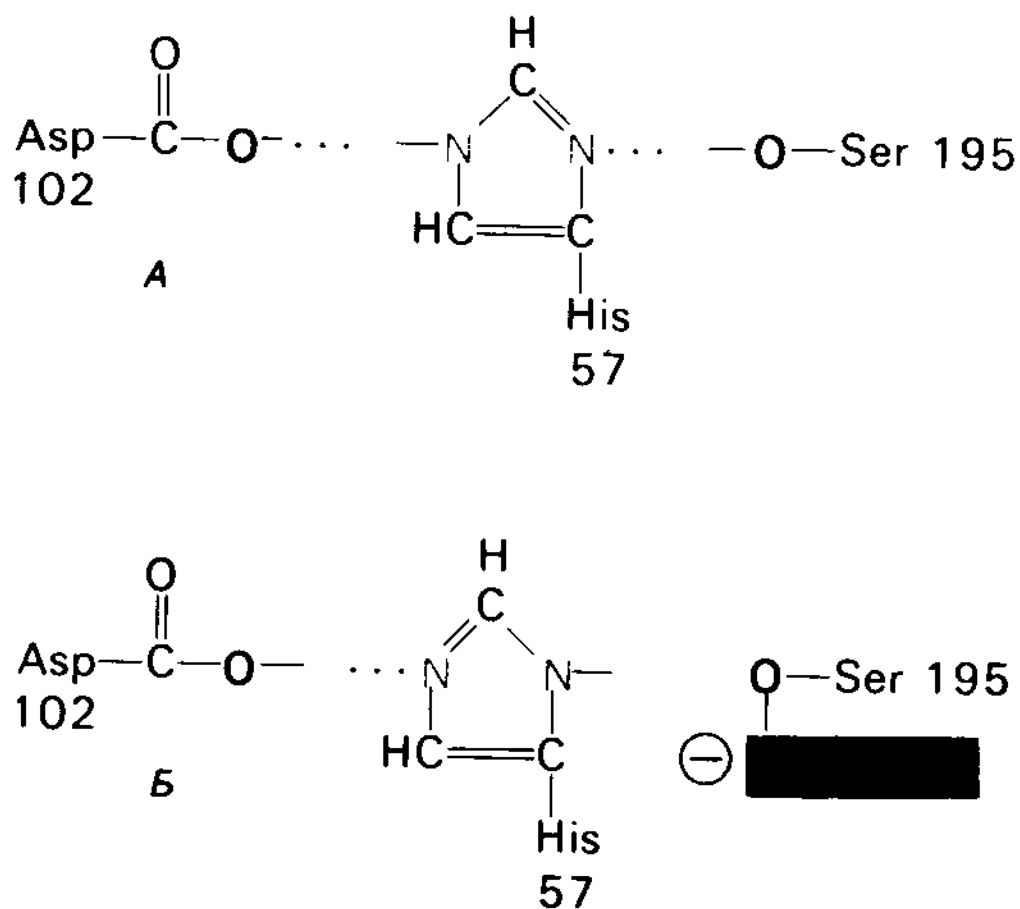


Рис. 8.15. Система переноса заряда в химотрипсине: *А* – фермент без субстрата; *Б* – при добавлении субстрата происходит промежуточное связывание протона аспартатом-102 и гистидином-57.

ную боковую цепь, которая хорошо соответствует по размеру карману на ферменте вблизи серина-195 (рис. 8.16). Именно наличием этого глубокого кармана объясняется специфичность химотрипсина в отношении аминокислот с ароматической или иной гидрофобной боковой цепью большого размера. При рентгеноструктурном анализе комплексов химотрипсина с аналогами полипептидных субстратов обнаружено большое число водородных связей между основными цепями фермента и субстрата, причем эти водородные связи располагаются так же, как в антипараллельных β-складчатых слоях.

8.9. В процессе катализа образуется переходное тетраэдрическое промежуточное соединение

Широкие рентгеноструктурные и химические исследования химотрипсина позволили прийти к определенному выводу относительно механизма его каталитического действия. По-видимому, *гистидин-57 и серин-195 непосредственно участвуют в расщеплении пептидной связи субстрата.* Гидролиз этой связи начинается с того, что кислородный атом OH-группы серина-195 атакует карбонильный атом углерода в гидролизуемой пептидной связи субстрата. В результате связь между атомами углерода и кислорода в этой карбонильной группе становится одинарной и атом кислорода приобретает отрицательный заряд. Четыре атома, связанные с углеродом карбонильной группы, располагаются в виде тетраэдра. Образование из плоской амидной группы этого *тетраэдрического промежуточного соединения* оказывается возможным только благодаря возникновению водородных связей между отрицательно заряженным атомом кислорода гидроксильной группы (называемым *оксианионом*) и двумя NH-группами самой полипептидной цепи (рис. 8.17). В механизме образования упомянутого промежуточного соединения важную роль играет также перенос протона от серина-195 на гистидин-57 (рис. 8.18). Перенос протона значительно облегчается благодаря присутствию системы переноса заряда. Аспартат-102 строго ориентирует положение имидазольного кольца гистидина-57 и частично нейтрализует заряд, появляющийся на этом кольце в момент переходного состояния. Протон, накопленный парой гистидин – аспартат, переходит далее к атому азота гидролизуемой пептидной связи, которая в результате разрывается. На этом этапе аминный компонент субстрата оказывается соединенным водородной связью с гистидином-57, а кислотный компонент – эфирной связью с серином-195. На этом завершается *стадия ацилирования* гидролитической реакции.

Следующая стадия – *деацилирование* (рис. 8.19). Аминный компонент субстрата диффундирует прочь от фермента, а на его место в активном центре встает молекула

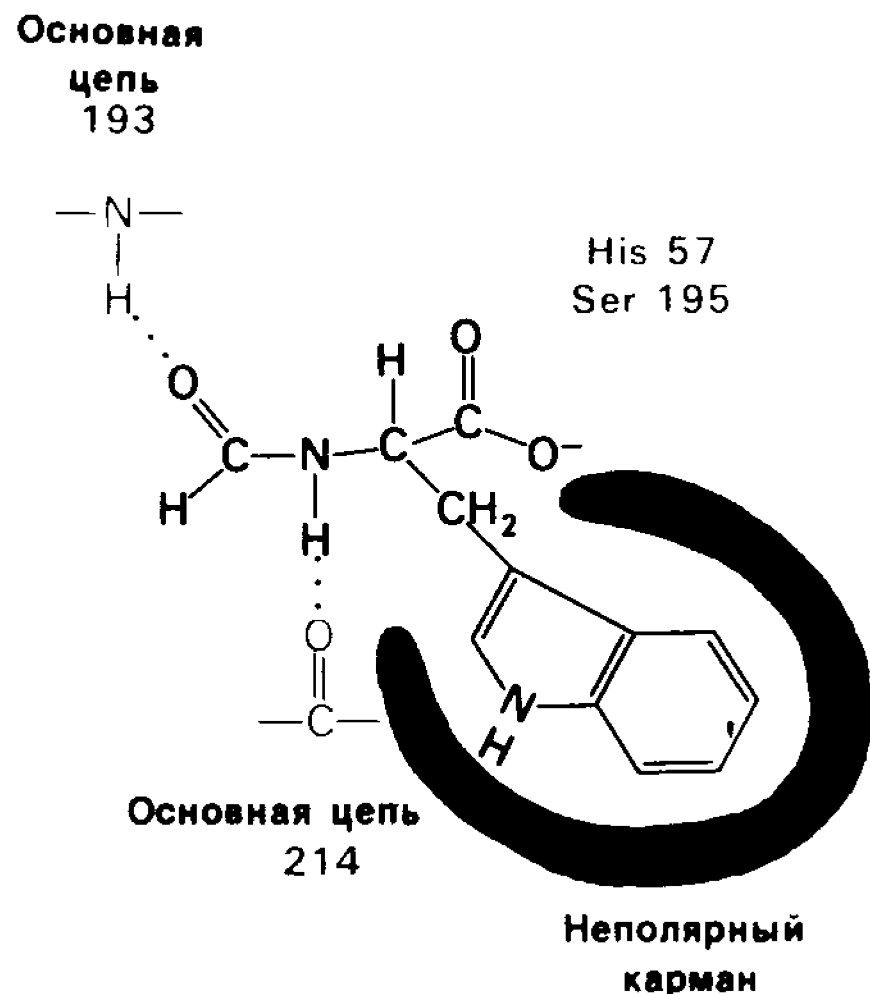


Рис. 8.16. Схематическое изображение присоединения к химотрипсину формил-L-триптофана (аналог субстрата).

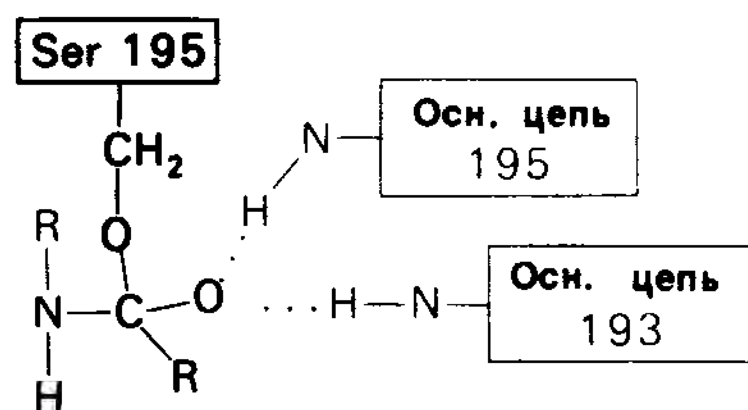


Рис. 8.17. Тетраэдрическое промежуточное соединение в реакциях ацилирования и деацилирования химотрипсина. Стабильность промежуточного соединения обеспечивают водородные связи, образованные NH-группами основной цепи фермента. Этот участок называется *полостью оксианиона.*

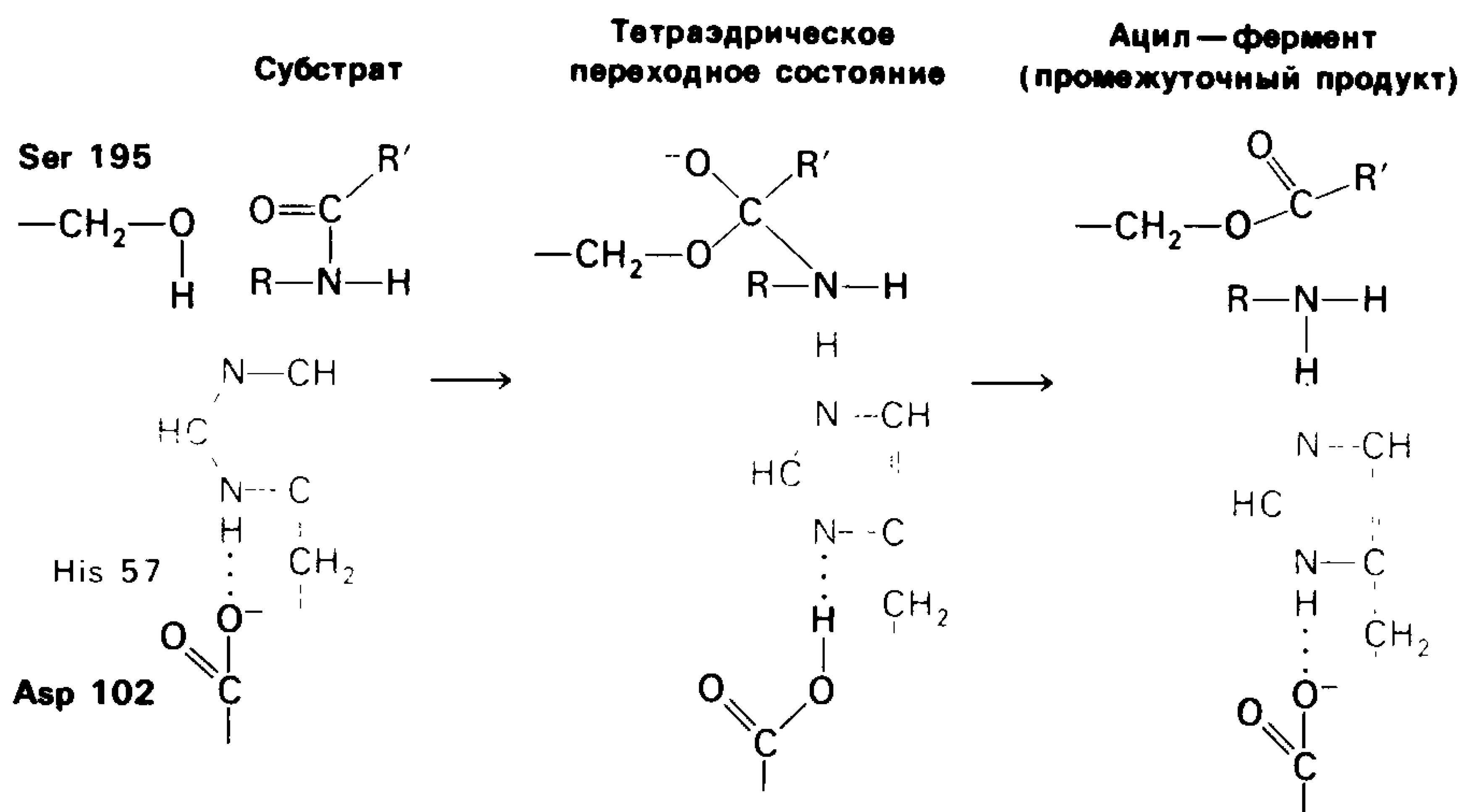


Рис. 8.18. Первый этап гидролиза пептидов химотрипсином – *ацилирование.* Образуется тетраэдрическое промежуточное соединение. Затем аминный компонент субстрата быстро отделяется от фермента, а фермент превращается в ацил—фермент – промежуточный продукт катализа.

воды. По сути *деацилирование – это процесс, обратный ацилированию, но с заменой аминного компонента субстрата на H_2O.* Сначала система переноса заряда отрывает протон от воды. Образующийся OH^--ион немедленно атакует карбонильный атом углерода ацильной группы, присоединенной к серину-195. Как и при ацилировании, формируется тетраэдрическое промежуточное соединение. Далее гистидин-57 передает протон на атом кислорода серина-195, что приводит к высвобождению кислотного компонента субстрата. Этот компонент отделяется путем диффузии от фермента, который может вступить в новый каталитический цикл.

8.10. Механизм активации профермента

Обратимся теперь к вопросу о том, каким образом расщепление всего одной пептидной связи в химотрипсиногене превращает его в активный фермент. Трехмерную структуру химотрипсиногема исследовал Джозеф Краут (J. Kraut), установивший, что в процессе активации фермента его конформация притерпевает ряд изменений.

1. Гидролиз пептидной связи между аргинином-15 и изолейцином-16 создает новые C- и N-концевые группы.

2. Вновь образованная *N-концевая группа изолейцина-16 загибается внутрь и взаимодействует с аспартатом-194* внутри молекулы химотрипсина (рис. 8.20). Протонирование этой аминогруппы стабилизирует активную форму химотрипсина, о чем свидетельствует характер зависимости ферментативной активности от pH.

3. Это электростатическое взаимодействие между положительно заряженной аминогруппой и отрицательно заряженным карбоксилат-ионом, происходящее в неполярной области фермента, запускает ряд конформационных сдвигов. Метионин-192 из глубины молекулы перемещается ближе к поверхности, а остатки 187 и 193 становятся более вытянутыми. В результате образуется *субстрат-специфичный участок* для ароматических и больших неполярных групп. Одну сторону этого участка составляют остатки от 189 до 192. *В проферменте эта полость для связывания части субстрата сформирована не полностью.*

4. Тетраэдрическое переходное состояние, возникающее при катализе химотрипсином, стабилизируется водородными связями между отрицательно заряженным атомом кислорода карбоксильной группы и двумя NH-группами самой полипептидной цепи (рис. 8.17). В химотрипсиногене одна из этих NH-групп расположена так, что недоступна для связывания. Следовательно, *в зимогене и полость оксианиона до конца не сформирована.*

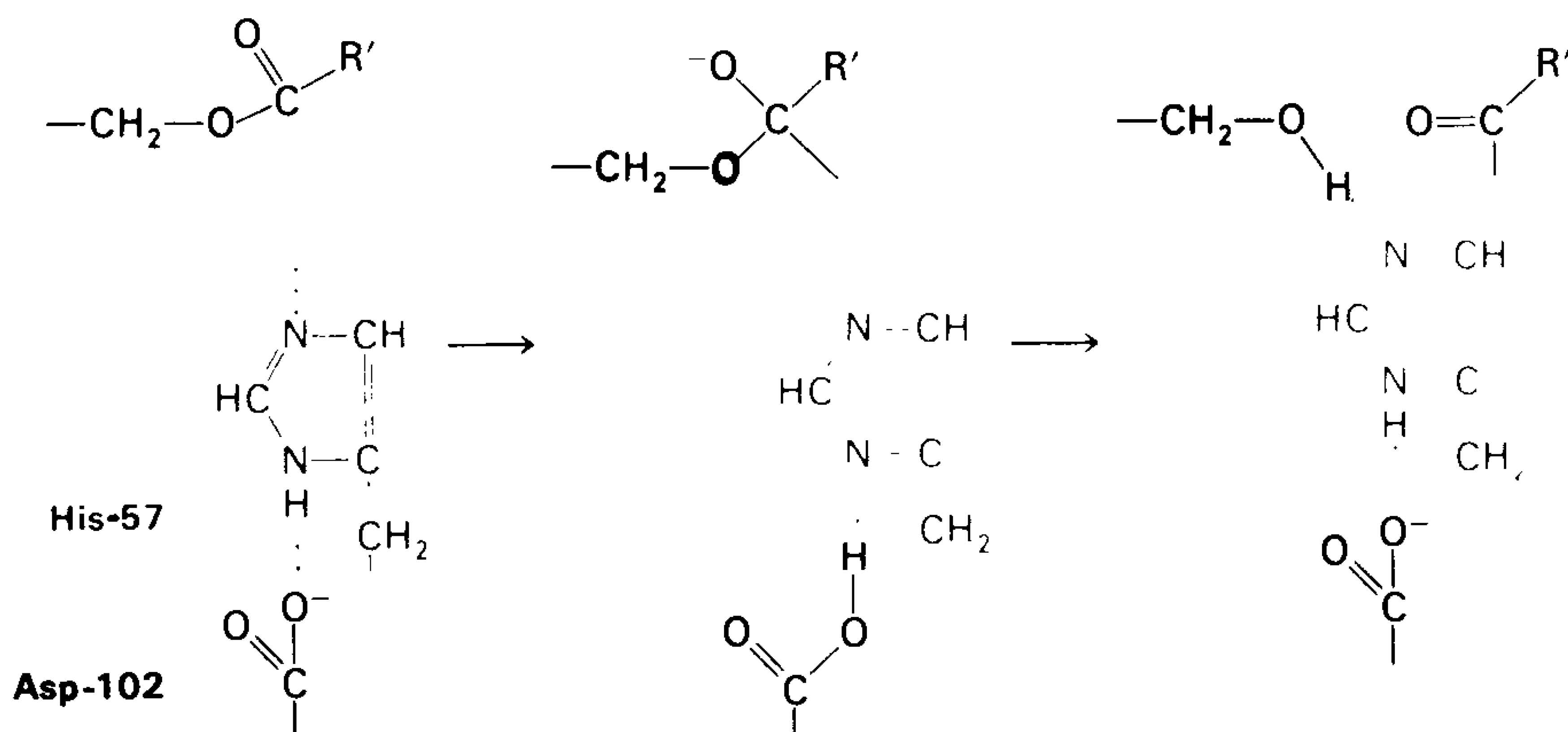


Рис. 8.19. Второй этап гидролиза пептида химотрипсином – *деацилирование.* Ацил—фермент (промежуточный продукт) гидролизуется водой. Деацилирование по существу представляет собой реакцию, обратную ацилированию, но на место аминного компонента субстрата становится H_2O.

5. Конформационные сдвиги в остальных частях молекулы очень незначительны. Таким образом, *«включение» ферментативной активности в белке осуществляется путем отдельных, строго локализованных конформационных сдвигов, запускаемых гидролизом всего лишь одной пептидной связи.*

8.11. Трипсин и эластаза: вариации на тему

Трипсин и эластаза сходны с химотрипсином во многих отношениях.

1. Все три фермента секретируются поджелудочной железой в виде проферментов и активируются путем расщепления одной-единственной пептидной связи. Возникающая при этом концевая аминогруппа загибается внутрь молекулы и электростатически связывается с карбоксилат-ионом аспартата-194.

2. Последовательность расположения около 40% аминокислот в этих трех ферментах идентична. Для аминокислотных остатков, локализованных во внутренней части молекулы, степень идентичности еще выше.

3. Фторофосфаты, в частности ДИФФ, игнибируют все три фермента. Подобно химотрипсину, и трипсин, и эластаза содержат в активном центре остаток серина. Более того, во всех трех ферментах одинакова последовательность аминокислот, окружающих серин:

Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro.

4. При рентгеноструктурном анализе было выявлено большое сходство третичной структуры этих трех ферментов (рис. 8.21). В эластазе и трипсине, как и в химотрипсине, имеется система переноса заряда, а также полость оксианиона.

5. Механизм каталитического действия всех трех ферментов почти одинаков. Их эффективность в качестве катализаторов обеспечивается тем, что они стабилизируют переходное состояние реакции. Полость оксианиона и система переноса заряда – это те существенно важные структурные элементы каждого из ферментов, которые способствуют образованию тетраэдрического промежуточного соединения.

Будучи сходными по структуре и механизму действия, эти ферменты поразительным образом различаются по специфичности. Субстрат химотрипсина должен иметь ароматическую или большую неполярную боковую цепь. Для трипсина требуется субстрат, содержащий лизин или аргинин. Ни один из этих субстратов не пригоден для эластазы, проявляющей специфичность в отношении небольших незаряженных боковых цепей. Как показал рентгеноструктурный анализ, эта разница в специфичности рассматриваемых ферментов обусловлена очень небольшими структурными различиями участков связывания субстрата (рис. 8.22). В химотрипсине ароматические

11-665

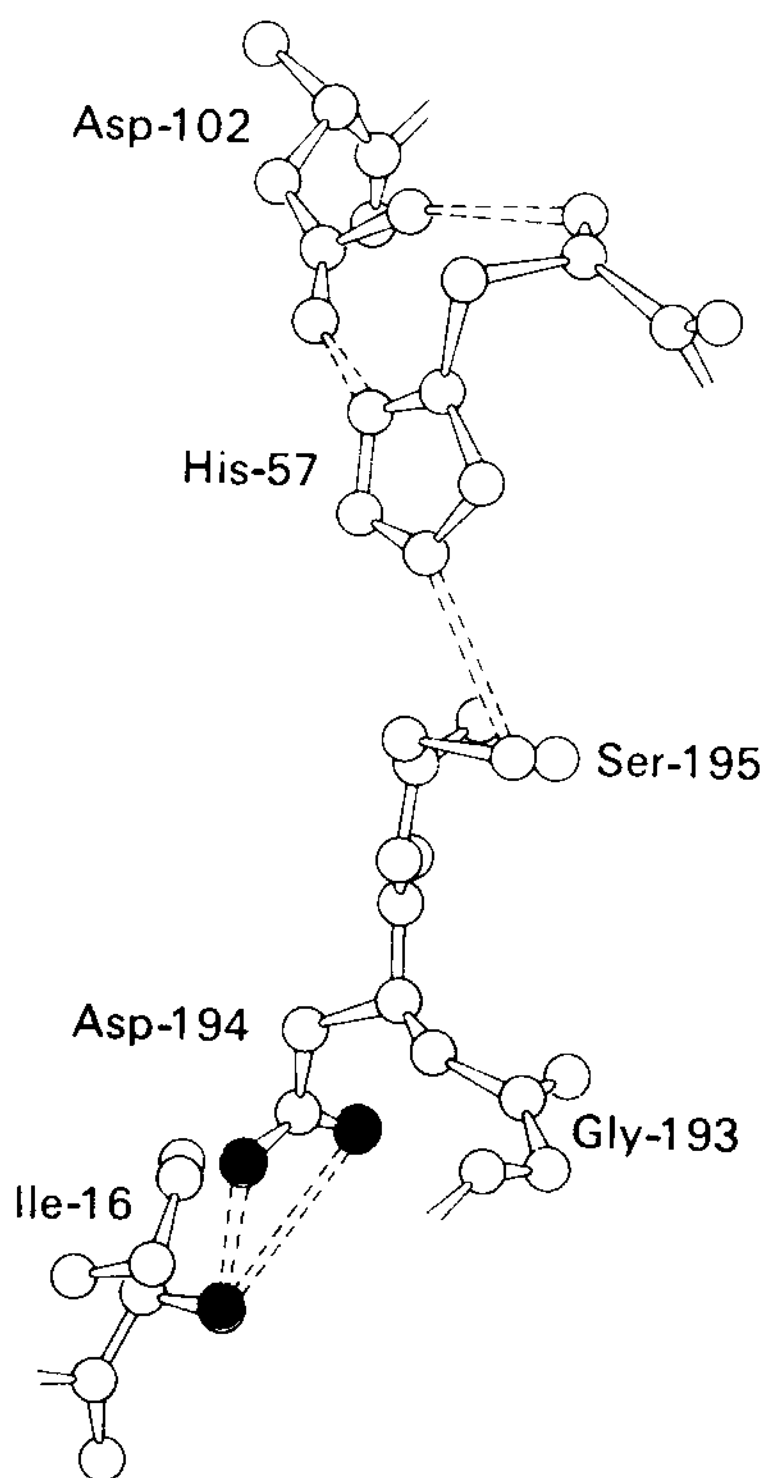


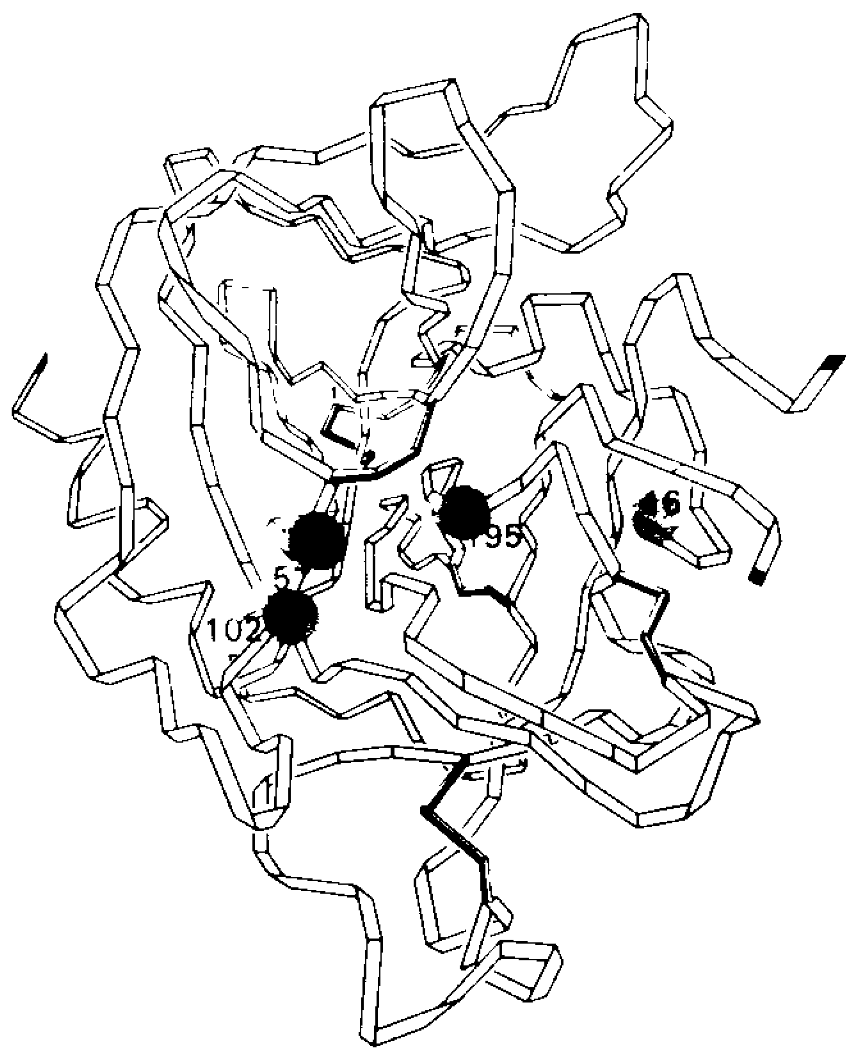
Рис. 8.20. Окружение аспартата-194 и изолейцина-16 в химотрипсине. Электростатическое взаимодействие между карбоксилат-ионом Asp-194 (красный) и α-NH_2-группой Ile-16 (синяя) играет важную роль в каталитической активности химотрипсина. Эти группы расположены в непосредственной близости к системе переноса заряда. [Blow D. M., Steitz T.-A., X-ray diffraction studies of enzymes, Ann. Rev. Biochem., **30**, 86 (1970).]

и большие неполярные боковые цепи субстрата размещаются в неполярном кармане. В трипсине имеется такой же карман, отличающийся, однако, от неполярного кармана химотрипсина заменой одного остатка – вместо серина стоит аспартат. Этот аспартат в неполярном кармане трипсина образует прочную электростатическую связь с положительно заряженными боковыми цепями лизина или аргинина субстрата. В эластазе же нет такого кармана для субстрата, поскольку два остатка глицина, выстилающие карман в химотрипсине, в эластазе заменены остатками валина и треонина, имеющими значительно бо́льшие размеры.

Структурные изменения, происходящие при активации трипсиногена, несколько отличаются от изменений, связанных с активацией химотрипсиногена. Рентгеноструктурные исследования, проведенные независимо Робертом Хьюбером и Робертом Строудом (R. Huber, R. Stroud), показали, что при активации трипсиногена происходят значительные изменения конформации четырех протяженных отрезков полипептида, составляющих примерно 15% молекулы. *Эти области, названные доменами активации, не имеют устойчивой структуры в проферменте, но приобретают строго определенную конформацию в трипсине.* Кроме того, полость оксианиона в трипсиногене расположена слишком далеко от гистидина-57 и поэтому не может способствовать образованию тетраэдрического промежуточного соединения.

8.12. Ингибитор панкреатического трипсина прочно связывается в активном центре трипсина

Регуляция активности панкреатических протеиназ осуществляется двумя различными путями. Первый – превращение профермента в активную протеиназу путем расщепления одной пептидной связи. Это очень точный механизм «включения» ферментативной активности, однако он необратим, и, следовательно, для остановки протеолиза должен существовать второй регуляторный механизм. Эту функцию выполняют специфические ингибиторы протеиназ. Например, *панкреатический ингибитор трипсина*, белок массой 6 кДа, ингибирует активность трипсина, очень прочно связываясь с его активным центром (рис. 8.23). Константа диссоциации комплекса составляет 10^{-13} М, что соответствует стандартной свободной энергии связывания примерно – 18 кДа/моль. Примечательная особенность этого взаимодействия состоит в том, что комплекс не диссоциирует ни в 8 М растворе мочевины, ни в 6 М гаунидингидрохлориде. Между тем эти денатурирующие агенты практически всегда вызывают диссоциацию олигомеров белка на составляющие субъединицы. Такая удивительная стабильность рассматриваемого комплекса объясняется тем, что ингибитор трипсина является очень эффективным аналогом субстрата. Рентгеноструктурный анализ показал, что



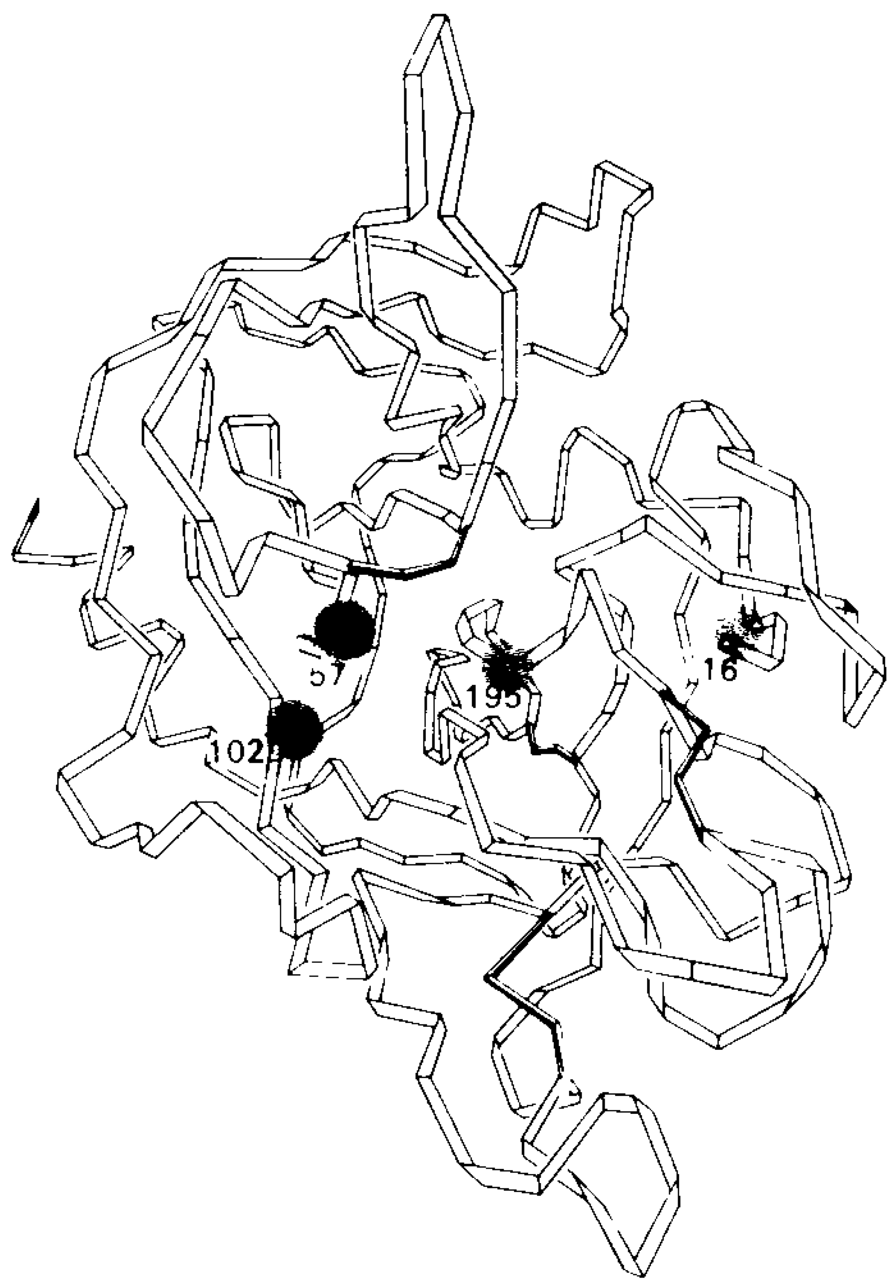


Рис. 8.21. Сравнение конформации основной цепи химотрипсина (*А*) и эластазы (*Б*). Локализация системы переноса заряда (остатки 102, 57 и 195) и α-аминогруппы остатка 16 выделена цветом, чтобы подчеркнуть сходство структуры этих ферментов. (Hartley B. S., Shotton D. M. In: The Enzymes, P. D. Boyer, ed., 3rd ed., v. 3, Academic Press, 1971, p. 362.)

боковая цепь лизина-15 в молекуле ингибитора соединяется с боковой цепью аспартата в субстрат-специфичном кармане фермента. Кроме того, между полипептидными цепями фермента и ингибитора возникает большое число водородных связей. Они располагаются так же, как водородные связи между ферментом и истинным субстратом. Но что самое главное – карбонильная группа лизина-15 и окружающие ее атомы ингибитора плотно входят в полость оксианиона в ферменте. Однако весь комплекс как будто застывает на этом промежуточном этапе катализа – видимо, потому, что гистидин-57 фермента, будучи неподвижным, лишен возможности перебросить протон на амидный азот ингибитора. Пептидная связь между лизином-15 и аланином-16 в панкреатическом ингибиторе трипсина расщепляется, но с крайне малой скоростью. Период полужизни комплекса трипсин – ингибитор составляет несколько месяцев. *Ингибитор обладает очень высоким средством к трипсину в силу почти идеальной комплементарности его структуры активному центру трипсина.* Ограниченная подвижность конформации ингибитора в участке его связывания с ферментом блокирует процесс катализа и приводит к исключительно высокой прочности комплекса с трипсином.

8.13. Дивергентная и конвергентная эволюция сериновых протеиназ

Химотрипсин, эластаза и трипсин обладают в целом сходной последовательностью аминокислотных остатков, поскольку они возникли из общего предшественника. Ген фермента-предшественника, по-видимому, несколько раз удваивался. В результате последующих мутаций этих генов появились в конце концов современные ферменты. Возникновение различной специфичности в ходе мутаций генов, произошедших от общего предшественника, представляет собой процесс *дивергентной эволюции.*

Сравнивая химотрипсин с бактериальным ферментом субтилизином, мы сталкиваемся с эволюционным процессом другого типа.

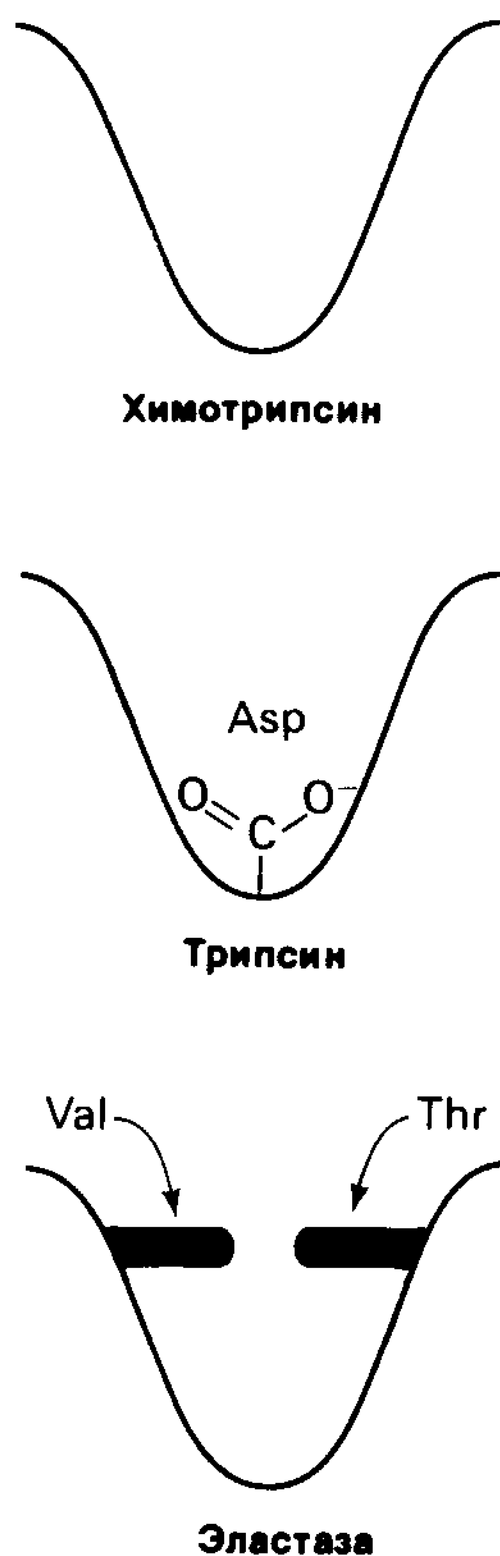


Рис. 8.22. Очень упрощенное изображение участка связывания субстрата в химотрипсине, трипсине и эластазе.

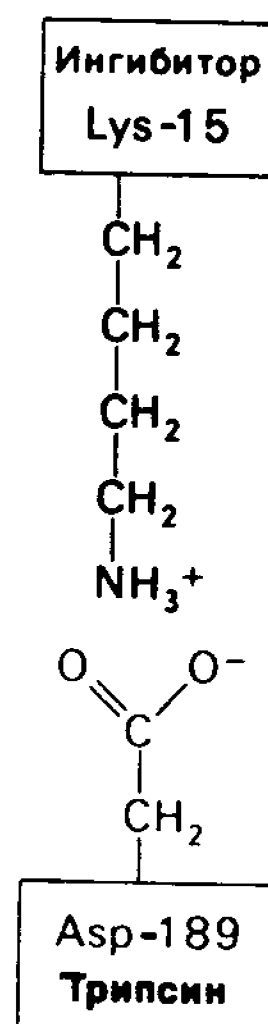


Рис. 8.23. Основной элемент взаимодействия панкреатического ингибитора трипсина с трипсином состоит в образовании электростатической связи между лизином-15 ингибитора и аспартатом-189 фермента. Кроме того, —NH_3^+-группа лизина-15 соединяется водородной связью с несколькими атомами кислорода в субстрат-специфичном кармане молекулы трипсина.

Субтилизин – это также сериновая протеиназа. Однако последовательности аминокислот в химотрипсине и субтилизине совершенно различны, что указывает на их независимое появление в процессе эволюции. Например, в молекуле химотрипсина имеется пять дисульфидных мостиков, тогда как в субтилизине – ни одного. Последовательность аминокислот вокруг серина в активном центре субтилизина и химотрипсина имеет следующий вид:

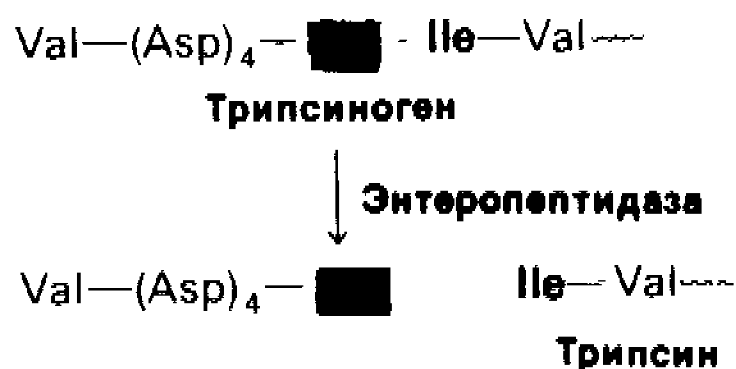
-Gly-Thr-Ser*-Met-Ala-Ser **в субтилизине**

-Gly-Asp-Ser*-Gly-Gly-Pro **в химотрипсине**

Совершенно различны трехмерные структуры этих ферментов. Тем более удивительным оказалось сообщение о том, что *в субтилизине имеется система переноса заряда*, состоящая, как и в химотрипсине, из остатков аспарагиновой кислоты, гистидина и серина. Более того, в субтилизине имеется полость оксианиона, стабилизирующая тетраэдрическое промежуточное соединение. Сходство системы переноса заряда, полости оксианиона и механизма катализа в случае субтилизина и химотрипсина – это поразительный пример *независимой, конвергентной эволюции* на уровне молекул ферментов. Почему независимые, параллельные эволюционные процессы привели к одному и тому же решению в таких разных случаях, как сериновые протеиназы поджелудочной железы позвоночных и бактериальный субтилизин? Как описывается далее (разд. 8.16), существует, по-видимому, довольно мало способов расщепления пептидных связей. Изучение нескольких сотен протеолитических ферментов показало, что имеется, быть может, только четыре основных типа механизмов протеолиза и что сериновые протеиназы распространены наиболее широко.

8.14. Координированная активация панкреатических проферментов

Расщепление белков в двенадцатиперстной кишке требует одновременного действия нескольких протеолитических ферментов, поскольку каждый из них специфичен в отношении ограниченного числа боковых цепей. Следовательно, все проферменты должны превращаться в активные ферменты в одно и то же время. Координированный контроль процесса активации достигается тем, *что для всех панкреатических проферментов* – трипсиногена, химотрипсиногена, проэластазы и прокарбоксипептидазы – *имеется один общий активатор – трипсин*. Откуда же берется достаточно большое количество трипсина, необходимое для активации этих проферментов? Дело в том, что клетки, выстилающие двенадцатиперстную кишку, секретируют фермент *энтеропептидазу*[1], которая по мере поступления трипсиногена в двенадцатиперстную кишку гидролизует в нем пептидную связь лизин – изолейцин. Образующееся при этом небольшое количество трипсина активирует трипсиноген и другие проферменты. Таким образом, *образование трипсина под действием энтеропептидазы этап активации активатора*:



8.15. Преждевременная активация проферментов может приводить к летальному исходу, в частности при панкреатите

Существует множество путей защиты поджелудочной железы от протеолитического действия синтезируемых ею ферментов. Прежде всего все панкреатические ферменты, гидролизующие белки, синтезируются в виде неактивных проферментов. Далее, в клетках поджелудочной железы они находятся в гранулах, окруженных белково-липидной мембраной. Еще одна мера защиты – присутствие в секрете поджелудочной железы ингибитора (разд. 8.12), инактивирующего те небольшие количества трипсина, которые могут в ней оказаться.

[1] Этот фермент был открыт Н.П. Шеповальниковым и описан им в диссертации «Физиология кишечного сока», изданной в 1899 г. Впоследствии ферменту было дано название «энтерокиназа».– *Прим. ред.*

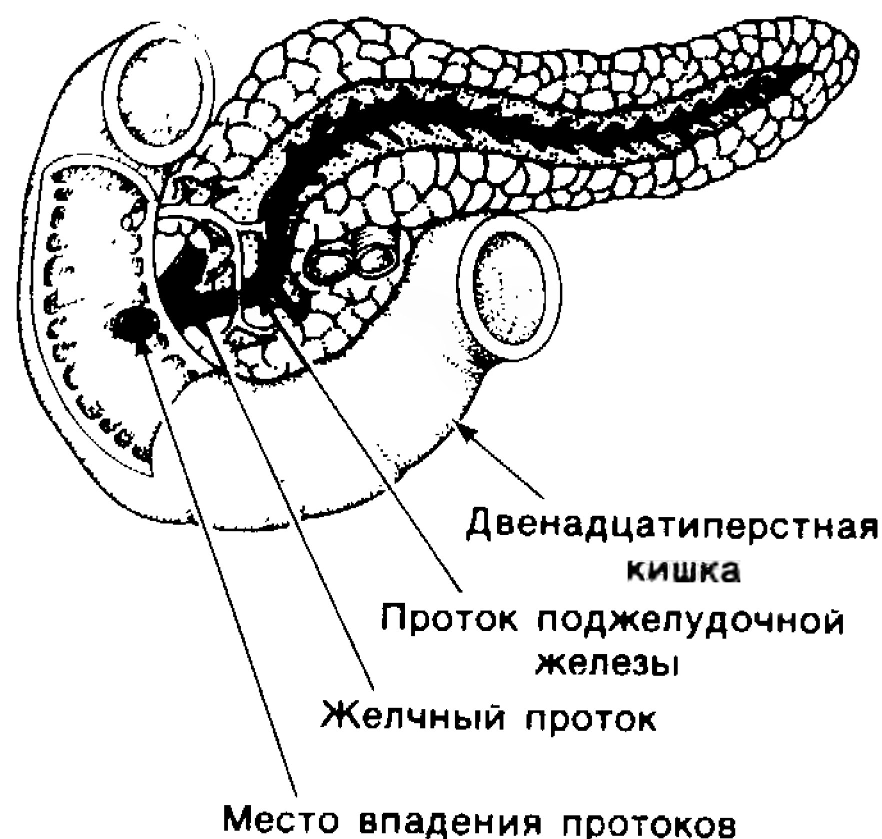


Рис. 8.24. Схематическое изображение поджелудочной железы и ее связи с тонкой кишкой.

Поджелудочная железа секретирует также липазы. Одна из них, а именно фосфолипаза A_2 синтезируется в виде профосфолипазы A_2, которая затем активируется трипсином. Другие ферменты, расщепляющие жиры, проявляют активность в присутствии солей желчных кислот, поступающих в двенадцатиперстную кишку из печени. Действие этих стероидов состоит в том, что они солюбилизируют липиды, тем самым делая их доступными для ферментативного расщепления липазами. Желчь синтезируется в печени, накапливается в желчном пузыре и из него выделяется в двенадцатиперстную кишку, где вместе с панкреатическими липазами участвует в расщеплении жиров.

Существует тяжелое, иногда со смертельным исходом, заболевание – *острый панкреатит*. Болезнь эта характеризуется *преждевременной активацией протеолитических и липолитических ферментов поджелудочной железы*. При панкреатите эти ферменты проявляют активность, еще находясь в самой поджелудочной железе. В результате происходит разрушение ткани железы и стенок пронизывающих ее сосудов. Причиной острого панкреатита может быть травма ацинарной ткани.

8.16. Основные типы протеолитических ферментов – это сериновые протеиназы и карбоксипротеиназы

До сих пор мы рассматривали два класса протеолитических ферментов, а именно

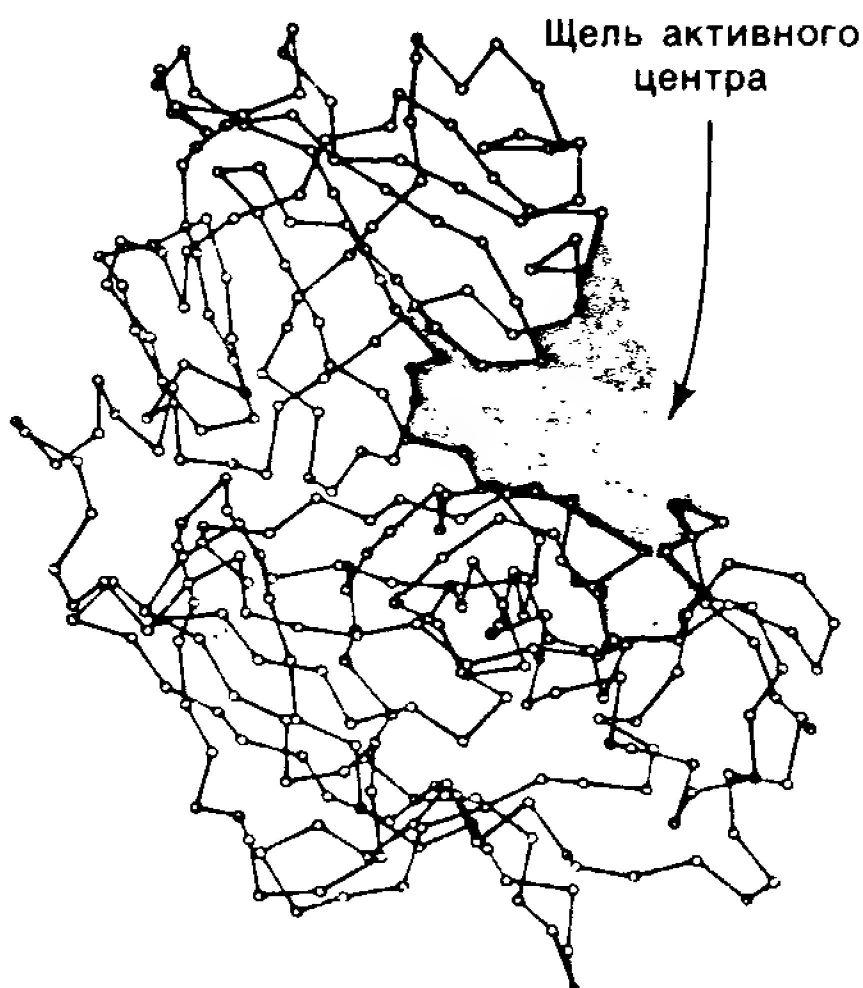


Рис. 8.25. Структура кислой протеиназы из плесени *Rhizopus*. Показаны α-углеродные атомы. Активный центр расположен между двумя долями молекулы во впадине, где размещаются 8 аминокислотных остатков субстрата. Пепсин имеет очень сходную структуру. [Subramanian E., Trends Biochem. Sci., 3, 2 (1978).]

цинксодержащие протеиназы (на примере карбоксипептидазы А – см. разд. 7.8) и *сериновые протеиназы*. Широко распространена также группа *тиоловых протеиназ*. Так, в папаине, получаемом из папайи, в активном центре имеется цистеин, роль которого аналогична роли серина-195 в химотрипсине. Катализ папаином протекает через образование тиоэфира в качестве промежуточного соединения; в катализе участвует расположенная вблизи боковая цепь гистидина. Другая большая группа протеолитических ферментов включает *карбоксипротеиназы*, или, как их еще называют, *кислые протеиназы*, поскольку большинство из них активно только в кислой среде. Наиболее известный представитель этой группы – *пепсин*, главный протеолитический фермент желудочного сока. Пепсин мол. массой 34,6 кДа образуется из пепсиногена (профермента) путем отщепления N-концевого пептида, состоящего из 44 аминокислотных остатков. Эта активация либо происходит спонтанно (при pH 2 и ниже), либо катализируется пепсином. В итоге пепсиноген, секретированный в полость желудка, превращается в пепсин в течение нескольких секунд. В активном центре пепсина содержатся два остатка аспартата. Для проявления ферментативной активности один остаток аспартата должен находиться в ионизированной, другой – в неионизированной форме; это определяет оптимум pH для пепсина – между 2 и 3. Сходные по структуре и ферментативным свойствам карбоксипротеиназы были выделены из лизосом, осуществляющих внутриклеточное расщепление (разд. 20.8), а также из различных плесневых грибов (рис. 8.25). Все карбоксипептидазы ингибируются *пепстатином* (аналогом гексапептидного переходного промежуточного соединения), добавленным в очень низких концентрациях (порядка 10^{-10} М).

8.17. Свертывание крови как каскад реакций активации проферментов

Активация белка-предшественника путем разрыва пептидной связи – это один из основных способов регуляции, свойственный различным биологическим системам. Сейчас мы рассмотрим роль активации проферментов при образовании кровяного сгустка, представляющем собой один из трех механизмов гемостаза. Два других способа регуляции – это быстрое сужение поврежденного сосуда и агрегация тромбоцитов на его стенке для защиты поврежденной поверхности сосуда.

Образование кровяного сгустка происходит в результате цепи последовательных превращений, осуществляемых при участии

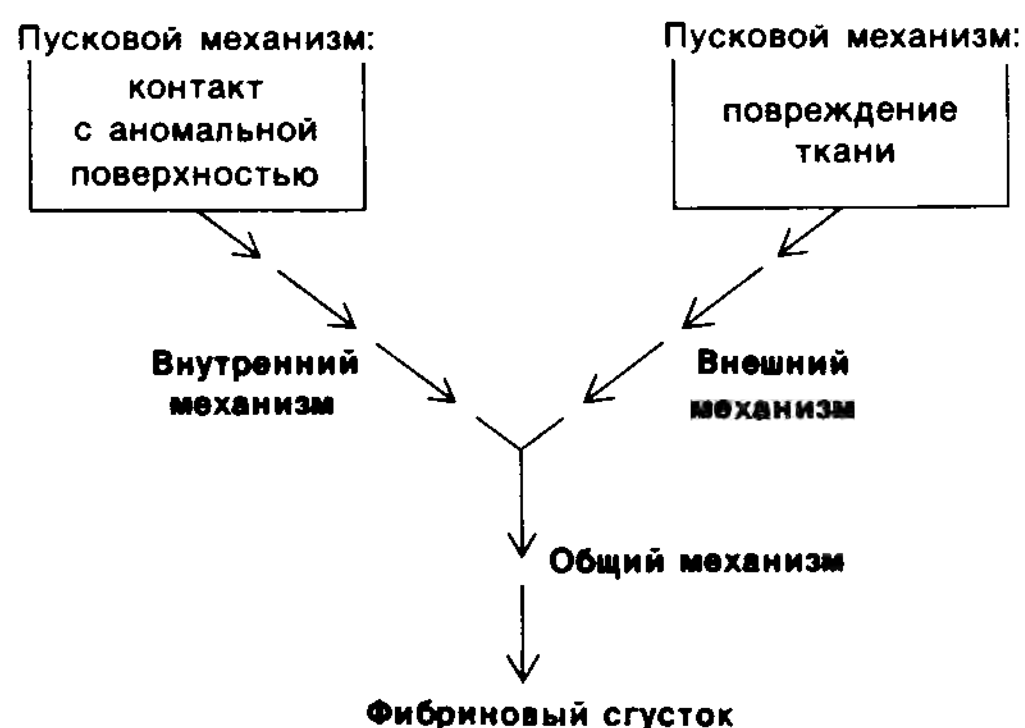


Рис. 8.26. В образование сгустка фибрина вовлекается взаимодействие трех путей превращений.

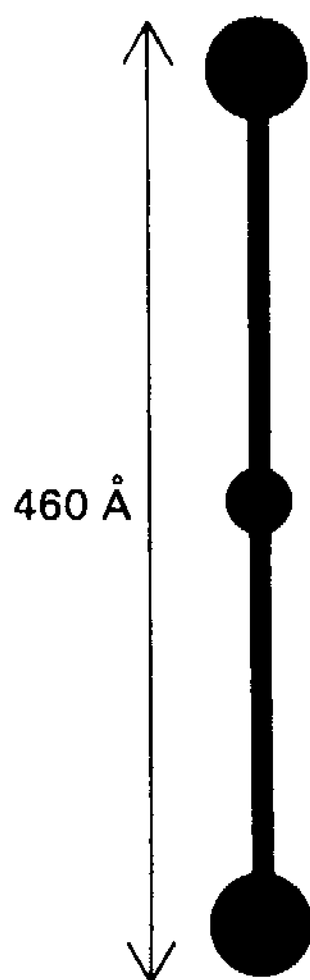


Рис. 8.27. Схематическое изображение молекулы фибриногена по данным электронной микроскопии.

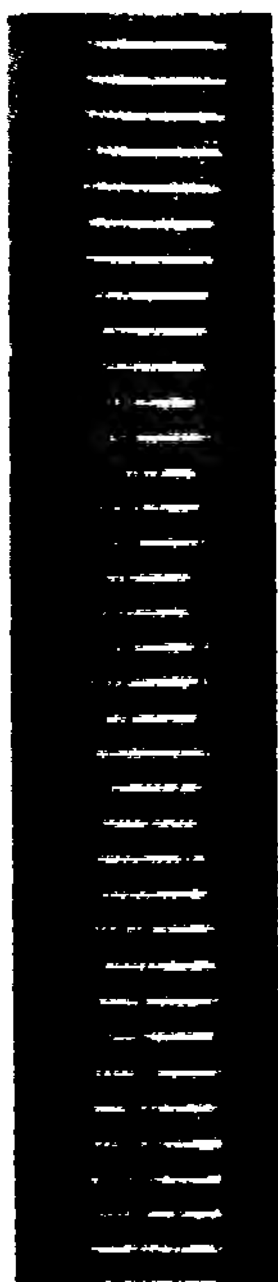


Рис. 8.28. Электронная микрофотография модифицированного фибриногена, обладающего упорядоченной структурой. Длина повторяющегося отрезка по оси волокна равна 225 Å, как и в фибрине. (Печатается с любезного разрешения д-ра C. Cohen.)

более чем 10 различных белков. Поразительная особенность этого процесса состоит в том, что он включает в себя *серию актов активации проферментов*. В этом *каскаде* ферментативных реакций активированная форма одного фактора свертывания крови катализирует активацию следующего. В силу каталитической природы процесса факторы, действующие на начальных этапах пути, требуются в очень малых количествах. Их эффект усиливается многократно благодаря большому числу последующих этапов, что обеспечивает в итоге быструю ответную реакцию на травму.

8.18. Образование кровяного сгустка требует взаимодействия двух типов ферментативных превращений

В 1863 г. Джозеф Листер (J. Lister) обнаружил, что в иссеченной яремной вене быка кровь остается жидкой, тогда как в стеклянной посуде она немедленно свертывается. Соприкосновение с неприродной поверхностью приводило к высвобождению компонентов, исходно присутствовавших в крови. Соответственно этот механизм (путь) свертывания крови был назван *внутренним*. Однако и вещества, в обычных условиях не присутствующие в крови, также могут вызвать свертывание. Так, при добавлении к плазме экстрактов многих тканей, в особенности мозга, происходит быстрое формирование кровяного сгустка. Этот механизм (путь) свертывания называется *внешним*.

При свертывании крови внешний и внутренний механизмы (пути) действуют взаимосвязанно (рис. 8.26). Для нормального свертывания крови необходимы оба механизма, о чем свидетельствуют различные нарушения способности к свертыванию крови, связанные с недостаточностью какого-либо из белков, участвующих лишь в одном из механизмов. Внешний и внутренний механизмы различаются только на начальных этапах, а затем они объединяются в *общий путь*, приводящий к образованию *фибринового сгустка*.

8.19. Фибриноген превращается в фибриновый сгусток под действием тромбина

Наиболее изученный этап процесса свертывания – это превращение фибриногена в фи-

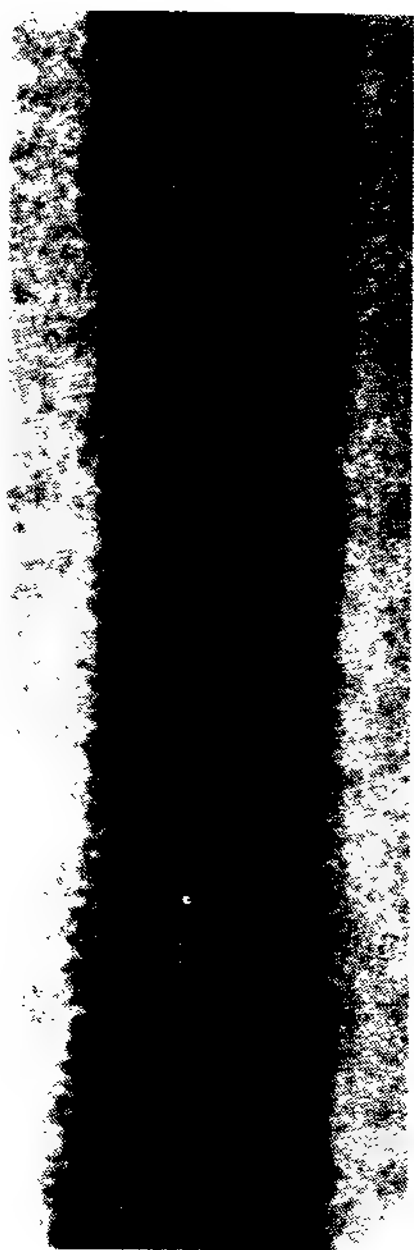


Рис. 8.29. Электронная микрофотография фибрина. Длина периода структуры по оси волокна составляет 230 Å, т.е. половину длины молекулы фибриногена. (Печатается с любезного разрешения д-ра H. Slayter.)

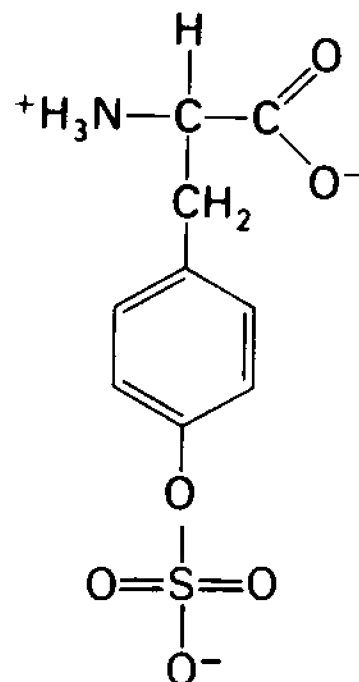
брин под действием протеолитического фермента – тромбина. Фибриноген отличается от рассмотренных ранее белков (например от лизоцима и химотрипсина) значительно большей массой и удлиненностью формы. По данным электронной микроскопии, фибриноген имеет вид трех узелков, соединенных двумя тяжами (рис. 8.27). Длина молекулы – 460 Å, масса – 340 кДа, что примерно в 10 раз больше массы химотрипсина. Фибриноген состоит из шести полипептидных цепей, которые попарно разделяются на три типа, причем первая пара обозначается Aα, вторая Bβ и третья γ.

Фибриноген, легко растворимый белок плазмы, в результате протеолитического действия тромбина превращается в нерастворимый мономер фибрина. Тромбин расщепляет в фибриногене четыре *пептидные связи между аргинином и глицином.* В результате этого расщепления высвобождаются четыре пептида: А-пептид из 18 остатков от каждой из двух α-цепей и В-пептид из 20 остатков от каждой из двух β-цепей. Эти А- и В-пептиды называют *фибринопептидами.* Молекула фибриногена, лишенная фибринопептидов, представляет собой *мономер фибрина.* Его субъединичная структура – $(\alpha, \beta, \gamma)_2$; он содержит около 97% аминокислотных остатков фибриногена.

8.20. Мономеры фибрина спонтанно образуют фибриллы

Растворимость мономеров фибрина значительно ниже растворимости фибриногена. Они спонтанно агрегируют, образуя *фибрин,* имеющий форму длинных нерастворимых нитей (фибрилл). Методами электронной микроскопии и дифракции рентгеновских лучей, направленных под малым углом, показано, что фибрин обладает периодической структурой с длиной повторяющегося участка 230 Å (рис. 8.29). Поскольку длина фибриногена составляет около 460 Å, т.е. вдвое больше, представляется вероятным, что мономеры фибрина при агрегации образуют параллельные ряды, сдвинутые относительно друг друга на пол молекулы (рис. 8.30).

Чем объяснить, что мономеры фибрина способны агрегировать, а фибриноген, из которого они образуются, – нет? Окончательный ответ на этот вопрос дадут проводящиеся детальные исследования структуры молекул. Все изученные к настоящему времени фибринопептиды всех видов позвоночных обладают *большим отрицательным зарядом.* В них обнаружено обилие остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот. Кроме того, в В-фибринопептиде имеется необычное отрицательно заряженное производное тирозина, а именно *тирозин-О-сульфат.* Видимо, наличие этих, а также и других отрицательно заряженных групп вызывает отталкивание молекул фибрино-



Тирозин-О-сульфат

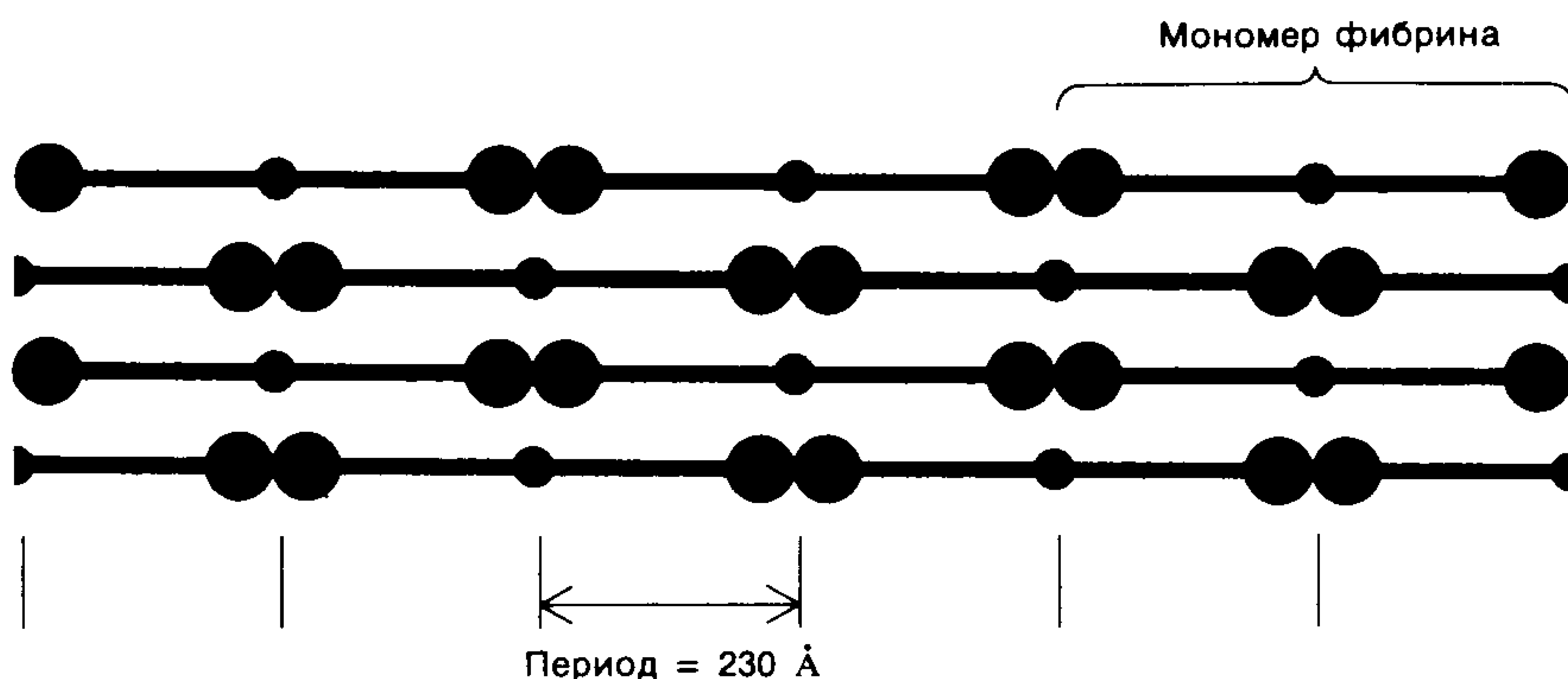


Рис. 8.30. Предполагаемое расположение мономеров фибрина в фибриновом сгустке. При такой укладке мономеров фибрина, когда параллельные ряды оказываются сдвинутыми относительно друг друга на полмолекулы, длина периода структуры составляет 230 Å в соответствии с реально существующей картиной.

гена друг от друга. *Высвобожденные тромбином мономеры фибрина обладают поверхностью с совершенно другими электрическими свойствами, обусловливающими способность к агрегации.* Вспомним, что замена всего лишь одной заряженной группы – глутамата на валин – является причиной агрегации дезоксигемоглобина при серповидноклеточной анемии.

8.21. Сгусток фибрина стабилизирован ковалентными поперечными связями

Сгусток, образующийся при спонтанной агрегации мономеров фибрина,– еще очень слабый и рыхлый. Затем он стабилизируется ковалентными поперечными связями между боковыми цепями отдельных молекул в фибриновых нитях. Установлено, что *в ходе реакции трансамидирования пептидные связи образуются между боковыми цепями специфических остатков глутамина и лизина* (рис. 8.31). Фермент, катализирующий эту реакцию,– трансамидаза. Поперечные связи указанного типа встречаются в белках крайне редко. Значение их видно из того, что у больных с врожденной недостаточностью трансамидазы повышена кровоточивость.

8.22. Тромбин гомологичен трипсину

Способность тромбина специфически расщеплять связь между остатками аргинина и глицина свидетельствует, по-видимому, о сходстве тромбина с трипсином. И действительно, такое сходство имеется, что явствует из сопоставления последовательностей остатков аминокислот в этих белках. Тромбин имеет массу 33,7 кДа и состоит из двух цепей. Цепь А из 49 остатков не проявляет заметной гомологии с ферментами поджелудочной железы. Цепь В, напротив, очень сходна с трипсином, химотрипсином и эластазой по последовательности аминокислот. Последовательность аминокислот



Рис. 8.31. Перекрестные связи в фибрине образуются в результате трансамидирования.

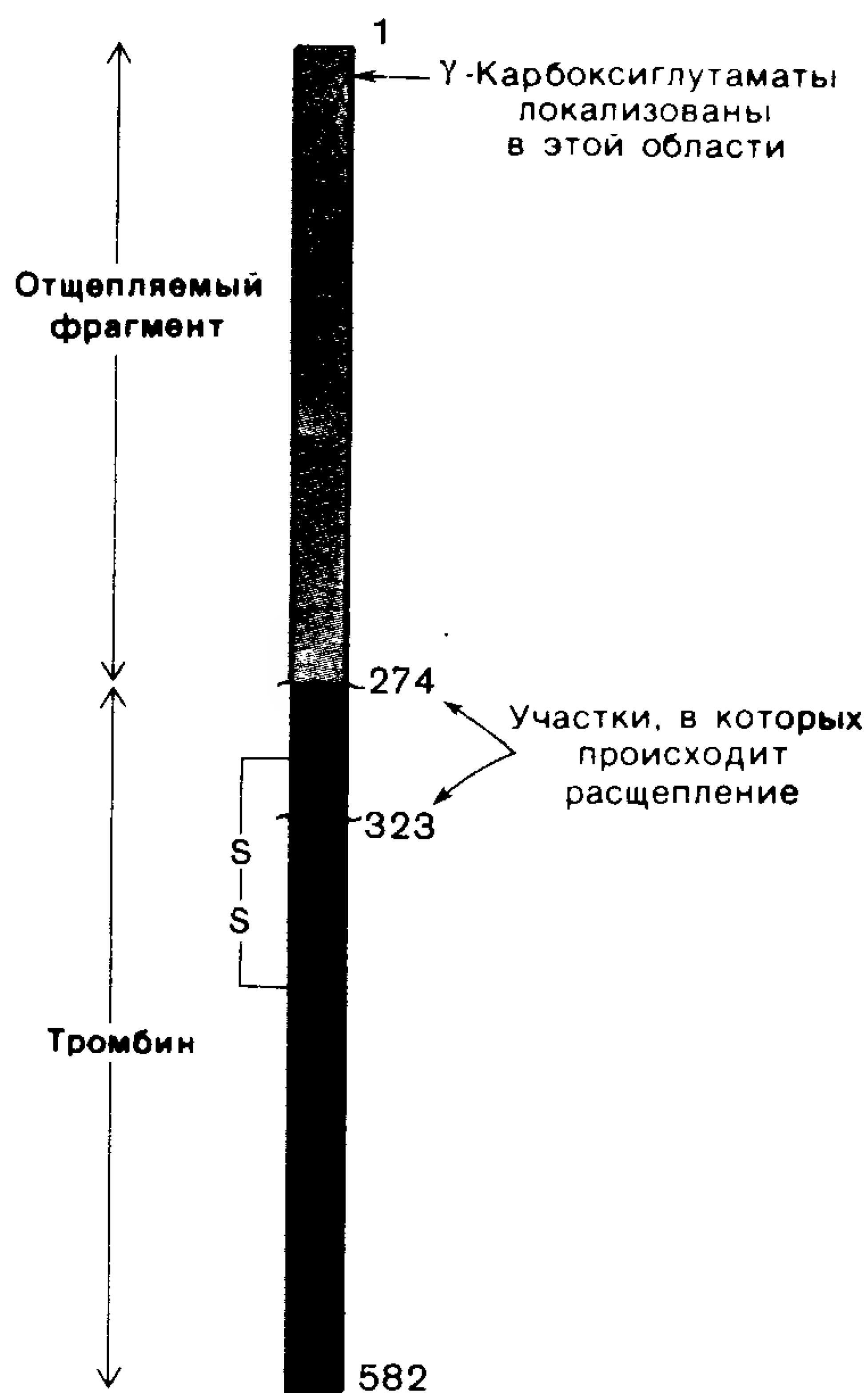


Рис. 8.32. Структура протромбина. В результате расщепления двух пептидных связей (Arg-274—Thr-275 и Arg-323—Ile-324) образуется тромбин. Красным показан отщепляемый N-концевой фрагмент протромбина, в котором локализованы все остатки γ-карбоксиглутамата. А- и В-цепи тромбина соединены дисульфидной связью.

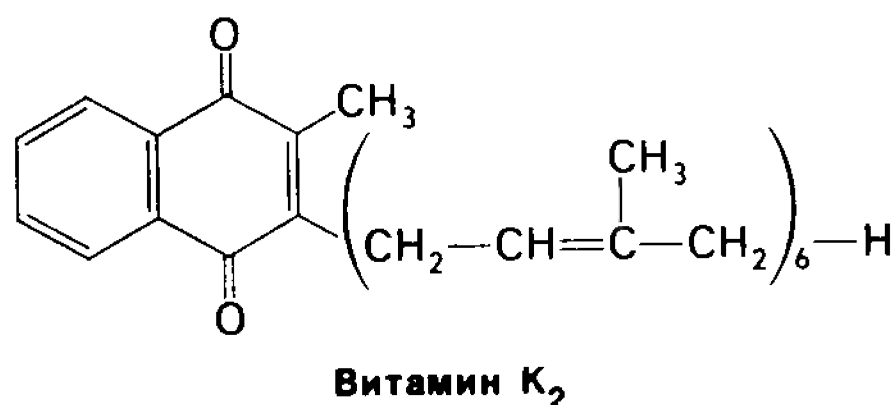
вокруг серина в активном центре тромбина: Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro, т.е. такая же, как и в сериновой протеиназе поджелудочной железы. Более того, в тромбине имеется и система переноса заряда. Ее трехмерная структура еще не раскрыта, но установлена одна важная особенность, характеризующая участок специфического связывания: в тромбине, как и в трипсине, на дне кармана, связывающего субстрат, находится остаток аспартата. Эта отрицательно заряженная группа несомненно должна электростатически связывать положительно заряженную боковую цепь аргинина субстрата. Специфичность тромбина значительно выше, чем специфичность трипсина: тромбин расщепляет только определенные связи аргинин-глицин, тогда как трипсин гидролизует почти любую пептидную связь, следующую за остатками аргинина или лизина.

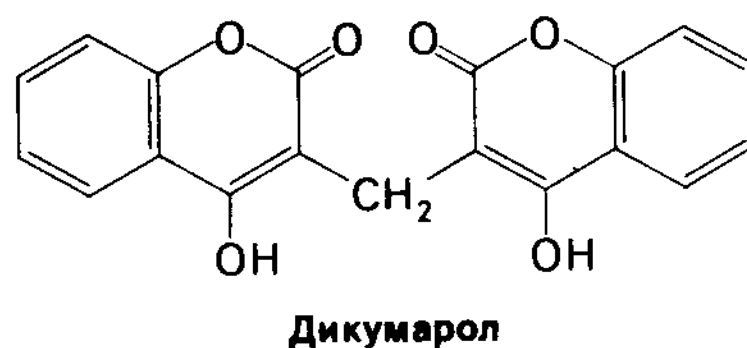
Как и панкреатические сериновые протеиназы, тромбин синтезируется в виде профермента-*протромбина*, имеющего мол. массу 66 кДа. В результате протеолитического расщепления связи аргинин—треонин с аминоконца протромбина высвобождается фрагмент массой 32 кДа (рис. 8.32). Последующее расщепление связи аргинин—лейцин приводит к высвобождению активного тромбина. В тромбине имеется также ионная пара, аналогичная ионной паре в химотрипсине между положительно заряженной аминогруппой изолейцина-16 и отрицательно заряженным аспартатом-194.

Сходство последовательностей аминокислотных остатков указывает на то, что *тромбин эволюционно близок к сериновым протеиназам поджелудочной железы*. Подтверждением этому служат также сходство механизмов активации сравниваемых ферментов и наличие в них системы переноса заряда. Примечательно, что протромбин синтезируется в печени, имеющей в процессе эмбриогенеза общее с поджелудочной железой происхождение.

8.23. Для синтеза протромбина необходим витамин К

На протяжении многих лет было известно, что витамин К необходим для синтеза протромбина и ряда других факторов свертывания крови. Однако механизм действия этого витамина удалось раскрыть совсем недавно путем исследования аномального протромбина, синтезируемого в отсутствии витамина К или же в присутствии антагониста витамина К, например дикумарола. *Дикумарол* содержится в гниющем доннике, и скот, получающий испорченное сено, погибает от геморрагической болезни. Производное дикумарола используется в медицине в качестве *антикоагулянта* для предотвращения тромбозов у больных с повышенной свертываемостью крови. Дикумарол, а также *варфарин* (рис. 8.33), родственный витамину К по структуре и его антагонист, нашли применение и в качестве сильного крысиного яда. Под влиянием дикумарола в крови коров появляется дефектный про-





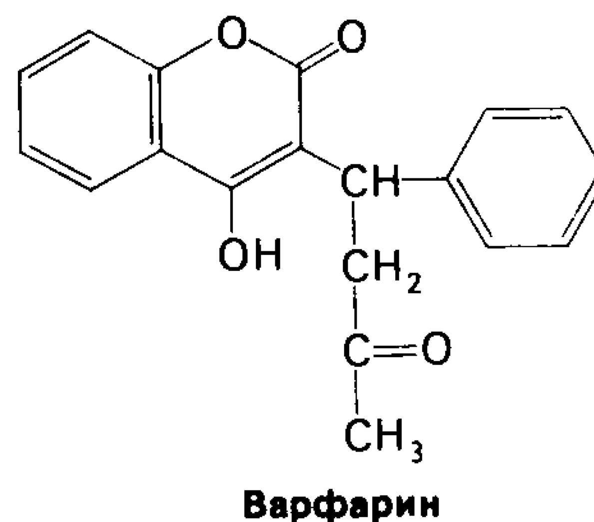
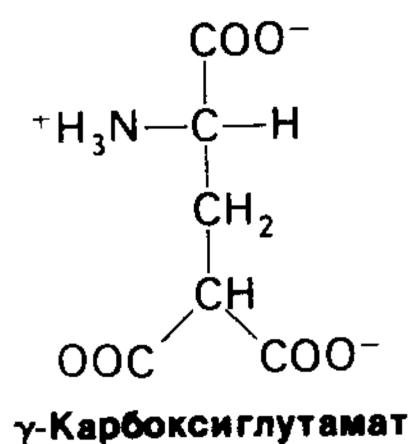


Рис. 8.33. Формулы витамина K_2 и двух его антагонистов – дикумарола и варфарина.

тромбин, который в отличие от нормального не способен связывать Ca^{2+}. Довольно долго это представлялось загадкой, потому что по количеству содержащихся аминокислот и по аминокислотному составу, определенному после кислотного гидролиза, дефектный протромбин не отличался от нормального. При разделении нормального протромбина на фрагменты было показано, что связывание Ca^{2+} происходит в N-концевой области белка (рис. 8.34). Далее было обнаружено, что N-концевой пептид аномального протромбина значительно отличается от соответствующего пептида нормального протромбина по электрофоретической подвижности. Изучение этих пептидов методом ядерного магнитного резонанса позволило установить, что в норме протромбин содержит ранее неизвестную аминокислоту – γ-карбоксилглутамат; в аномальном протромбине эта модифицированная аминокислота отсутствует. Как оказалось, *первые десять остатков глутамата в N-концевой области протромбина карбоксилированы в γ-карбоксилглутамат, причем это карбоксилирование осуществляется витамин-К-зависимой ферментативной системой*. Указанную аминокислоту не удавалось выявить вплоть до последнего времени, потому что при кислотном гидролизе происходит потеря γ-карбоксигруппы и γ-карбоксиглутамат определяется как глутамат:



8.24. На фосфолипидной поверхности тромбоцитов протромбин активируется фактором X_a

Каскадный характер процесса свертывания крови показан на рис. 8.35. Протромбин активируется протеолитическим ферментом, называемым фактором X_a. Для удобства факторы свертывания крови обозначаются римскими цифрами. Буква «а» показывает, что фактор находится в активной форме. Итак, протромбин превращается в тромбин в результате протеолитического действия фактора X_a. Это превращение (протромбин → тромбин) ускоряется под влиянием фактора V. Фактор V – не фермент; это как бы *белок-модификатор*.

В результате зависимой от витамина К реакции карбоксилирования глутамат (слабо хелирующий Ca^{2+}) превращается в γ-карбоксиглутамат, являющийся сильным хелатирующим агентом. Связываясь с Ca^{2+}, протромбин заякоривается на фосфолипидных мембранах тромбоцитов, скапливающихся в месте повреждения. Функциональное значение присоединения протромбина к фосфолипидным поверхностям со-

стоит в том, что протромбин оказывается в непосредственной близости от факторов X_a и V, а это ускоряет его активацию более чем в 10^4 раз. На этом этапе активации N-концевой фрагмент протромбина, содержащий участки связывания Ca^{2+}, отщепляется. В результате тромбин высвобождается из связи с фосфолипидными поверхностями и,

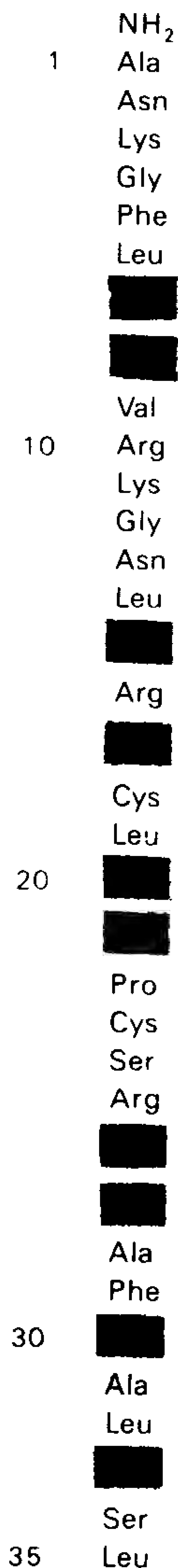


Рис. 8.34. Последовательность аминокислот N-концевой части протромбина [остатки γ-карбоксиглутамината (Gla) показаны красным].

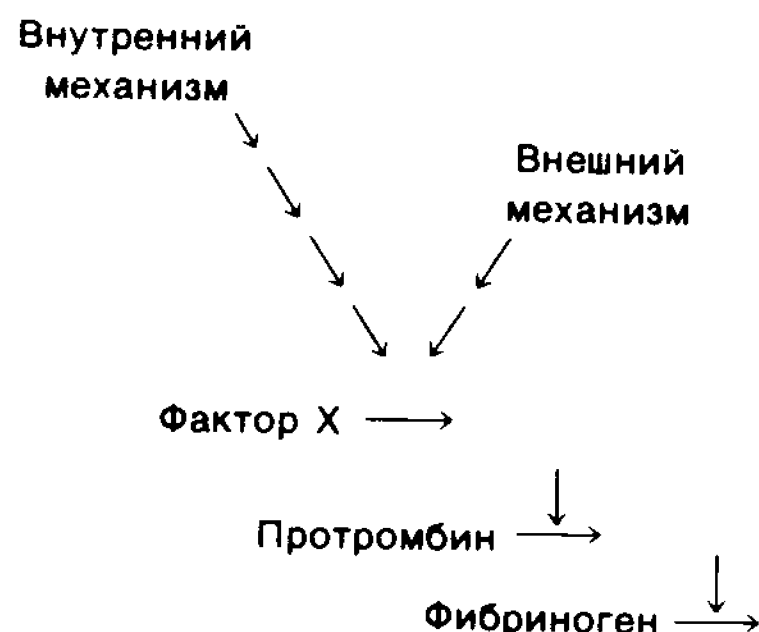


Рис. 8.35. Конечные этапы образования фибринового сгустка. Указанные три реакции составляют общий механизм свертывания крови. В активации фактора X участвуют продукты как внутреннего, так и внешнего механизма.

находясь в свободном виде, может активировать фибриноген плазмы.

Каким образом активируется фактор X? Этап его активации знаменует собой объединение внутреннего и внешнего механизмов свертывания крови. Оба механизма приводят к появлению протеолитических ферментов, активирующих фактор X.

8.25. Гемофилия и другие формы нарушения свертывания крови позволили выявить ряд начальных этапов образования кровяного сгустка

Биохимическое исследование начальных этапов свертывания крови оказалось значительно сложнее, чем исследование конечных этапов, поскольку факторы, действующие на начальных этапах, находятся в крови в очень малом количестве. Так, если содержание фибриногена в 1 мл крови составляет 3 мг, то содержание фактора X – только 0,01 мг. Концентрация ряда других факторов, обеспечивающих самые начальные этапы свертывания, еще ниже. Кроме того, эти факторы крайне лабильны. В силу указанных причин плодотворным оказался другой подход, а именно исследование больных с нарушением свертывания крови.

Наиболее известное заболевание такого типа – *гемофилия*. Это нарушение свертывающей способности крови передается по наследству как сцепленный с полом рецессивный признак. Женщины, гетерозиготные по этому признаку, передают дефектный ген потомству, причем само носительство де-

фектного гена проходит бессимптомно. Известным кондуктором гемофилии была королева Виктория, передавшая дефектный ген в монархические семьи Пруссии, Испании и России (рис. 8.36).

Царевич Алексей родился в 1904 г. Он был единственным наследником в царской династии, правившей Россией с XVII в. К тому времени, когда родился царевич, у царя Николая II и императрицы Александры, внучки королевы Виктории, были четыре здоровые дочери. Уже через 6 недель после рождения царевича его отец отметил в дневнике: «Нынче утром без всякой видимой причины у маленького Алексея кровоточил пупок. Кровь шла с небольшими перерывами до самого вечера». Признаки болезни усилились, когда Алексей начал ползать и ходить; на руках и на ногах у него стали появляться большие вспухшие синяки. Кровоподтеки становились все крупнее, однако врачи были бессильны и не могли облегчить состояния больного. Отчаявшаяся императрица обратилась тогда к Распутину, имевшему репутацию исцелителя. Никто в истории не имел меньшего представления о молекулярных основах гемофилии, и никто в истории не получил большего дохода от нее. В течение многих лет Распутин обладал огромным влиянием при русском дворе, так как императрица слепо верила в его способность исцелять.

Как мог состояться брак между Николаем и Александрой, если уже было известно, что ее брат, племянники и дядя страдают гемофилией? Еще в 1873 г. французский врач Грандидье (Grandidier) рекомендовал, «чтобы все члены семьи больного с кровоточивостью воздерживались от брака». Более того, на наследственную природу этого заболевания еще в 1803 г. указывал Джон Отто (J. Otto):

> «Около 70 или 80 лет тому назад женщина по фамилии Смит (Smith) поселилась поблизости от Плимута, графство Нью-Гемпшир, и передала своему потомству следующую идиосинкразию... Удивительным образом только у мужчин возникало это странное заболевание, причем не все мужчины в семье были подвержены ему... Хотя женщины не болели, однако они были способны передавать болезнь своим сыновьям.»

Как писал Дж. Халдейн (Halldane), «царствующие особы тщательно ограждены от столкновения с неприятной реальностью... Гемофилия царевича Алексея была симптомом полного непонимания реальности царствующим домом».

8.26. Внутренний механизм свертывания крови

При гемофилии нарушен внутренний механизм свертывания крови (рис. 8.37) – белок, называемый *антигемофильным фактором* (фактор VIII), либо совсем отсутствует, либо его активность резко снижена. Этот белок, действуя вместе с фактором IX_a (протеолитическим ферментом), активирует фактор X. Сам антигемофильный фактор является не ферментом, а белком-модификатором.

Любопытна история открытия фактора IX. Мальчик по имени Стефен Кристмас (S. Christmas) страдал нарушением свертывания крови, клинически не отличимым от классической гемофилии ни по симптоматике, ни по типу наследования. Как и при гемофилии, время свертывания его крови, помещенной в стеклянную пробирку, было увеличено. Попробовали смешать его кровь с кровью больного гемофилией и с удивлением обнаружили, что время свертывания смешанной крови оказалось почти на уровне нормы. Отсюда со всей очевидностью следовало, что, несмотря на идентичность клинической картины заболеваний, молекулярные дефекты у Стефена Кристмаса и больного гемофилией различны. У двух этих больных отсутствовали различные факторы свертывания, поскольку в противном случае плазма их крови была бы не способна к взаимной комплементации. Так был открыт новый фактор, обозначенный как фактор IX, или *кристмас-фактор*. Вообще *тест на комплементацию является надежным методом исследования, позволяющим определить, одни и те же или разные компоненты отсутствуют в двух сравниваемых неактивных системах*. Ценность этого метода состоит в том, что он дает возможность пронумеровать отдельные компоненты системы еще до того, как удается их выделить и получить в очищенном виде. Тест на комплементацию широко используется в генетических исследованиях вирусов и бактерий.

Кристмас-фактор отделен двумя этапами от пусковой реакции внутреннего механизма свертывания. Пусковым моментом этой последовательности реакций служит кон-

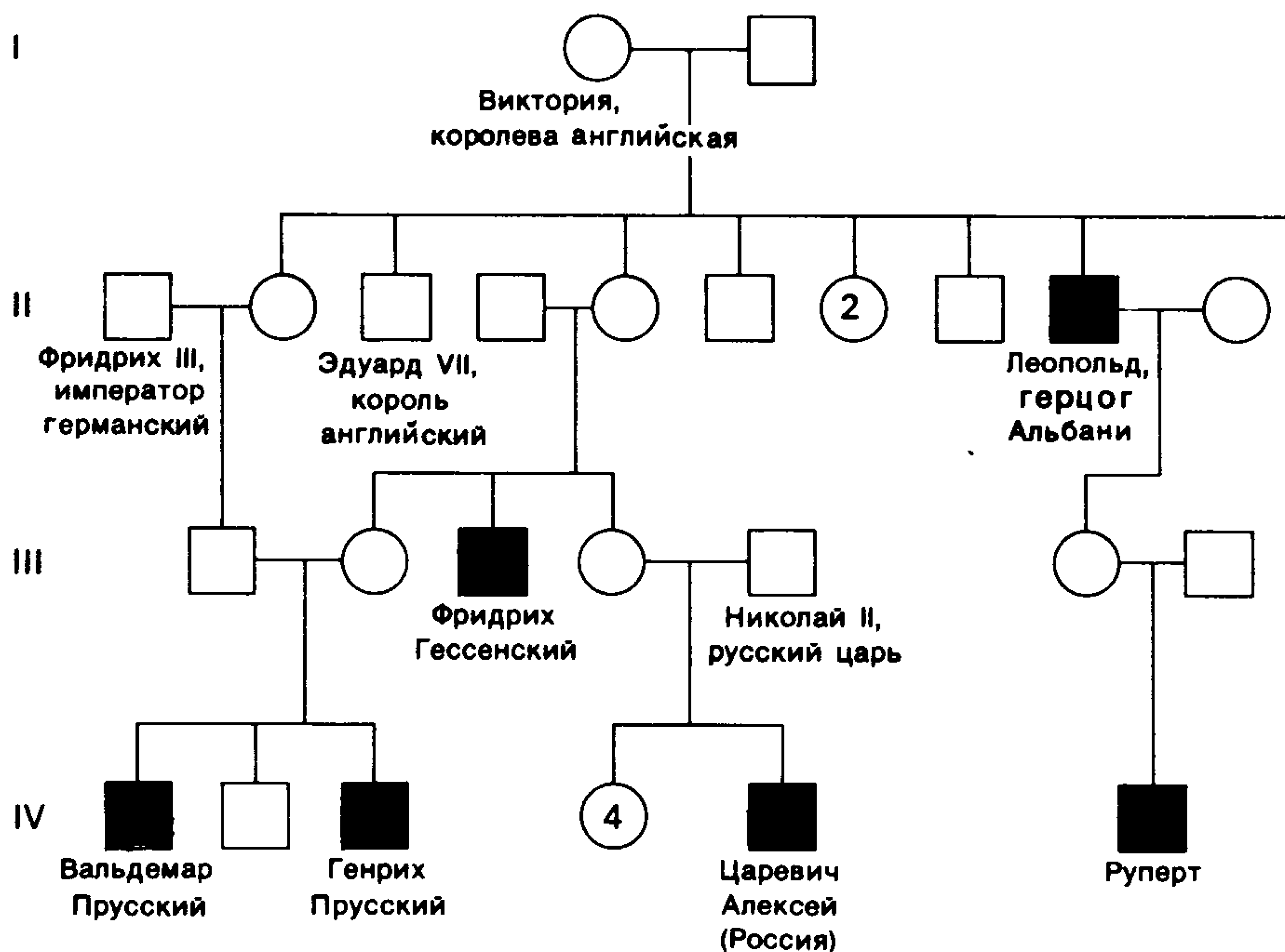


Рис. 8.36. Генеалогия гемофилии в монархических семьях Европы. На схеме указаны все дети королевы Виктории и выборочно – внуки и правнуки. Лица женского пола обозначены кружками, мужского – квадратами; больные гемофилией показаны красным. (Stern C., Principles of Human Genetics, 3rd ed., W. H. Freeman and Co., Copyright 1973.)

такт фактора XII с аномальной для крови поверхностью. Активированный в результате этого контакта фактор XII_a вместе с калликреином и кинином превращает фактор XI в активную форму – фактор XI_a, который в свою очередь активирует кристмасс-фактор (IX). На всех этих этапах активации проферменты превращаются в активные ферменты.

8.27. Внешний механизм свертывания крови

Внешний механизм свертывания, как и внутренний, в конечном итоге приводит к активации фактора X. Внешний механизм (рис. 8.38) относительно прост. При повреждении кровеносного сосуда высвобождается так называемый *тканевой фактор* липопротеиновой природы. Комплекс тканевого фактора и фактора VII катализирует активацию фактора X. Тканевой фактор функционирует как белок-модификатор, поскольку в его отсутствие фактор VII лишен активности. Таким образом, в процессе свертывания крови участвует по крайней мере 3 белка-модификатора: фактор V, фактор VIII и тканевой фактор.

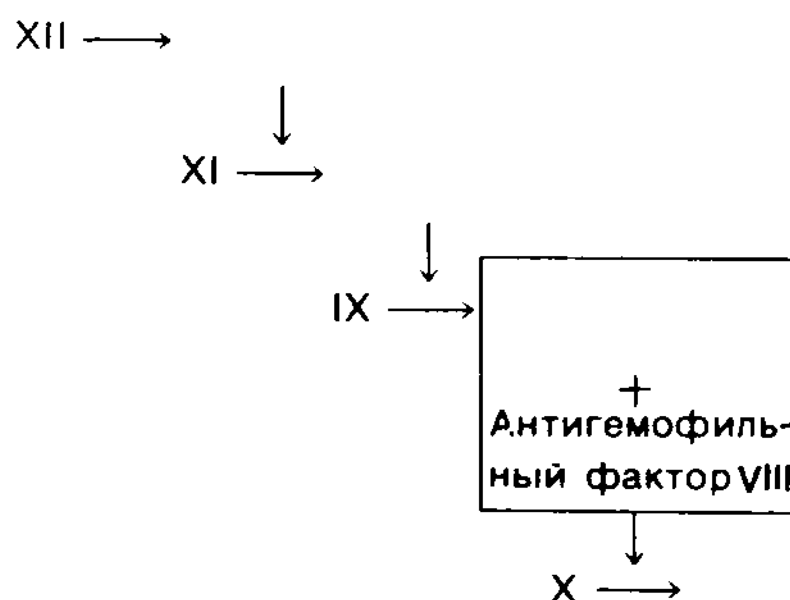
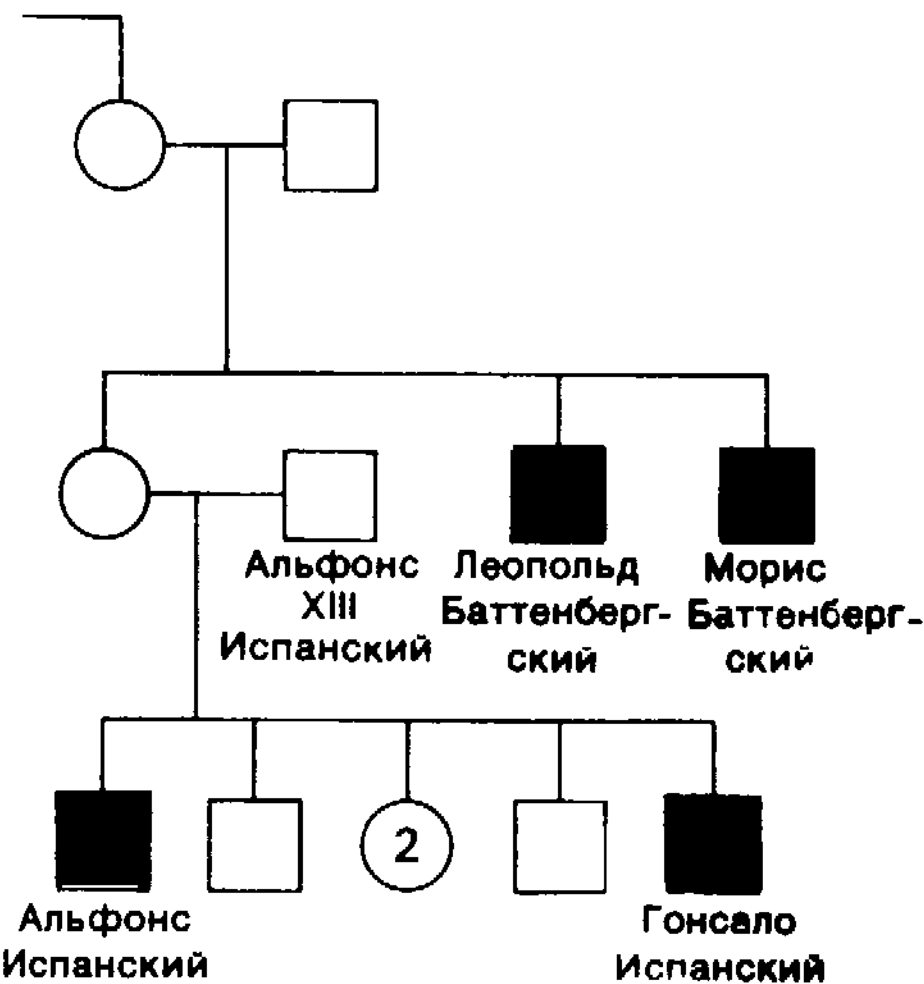


Рис. 8.37. Внутренний механизм свертывания крови. Неактивные формы факторов свертывания показаны красным, активированные – желтым. Активированные факторы катализируют активацию следующих.



8.28. Контроль свертывания крови: проблема, требующая внимания

Вполне очевидно, что свертывание крови должно регулироваться очень точно. Грань между геморрагией и тенденцией к тромбообразованию едва уловима. Образование кровяного сгустка должно происходить очень быстро, но при этом лишь в пределах поврежденного участка сосуда. Почему же этот процесс включает столько этапов? Почему существуют внутренний и внешний механизмы и как они связаны между собой? Какие механизмы ограничивают процесс тромбообразования участком повреждения? Эти вопросы интересны не только сами по себе, но и в связи с практическими задачами предупреждения и лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Существенную роль в регуляции тромбообразования играет лабильность активированных факторов свертывания. Их продолжительность жизни очень короткая, поскольку они быстро разводятся в кровотоке, удаляются из кровеносного русла печенью, расщепляются протеиназами, инактивируются специфическими ингибиторами. Наиболее важную роль среди специфических ингибиторов играет *антитромбин III*, белок плазмы, инактивирующий тромбин путем образования с ним стабильного комплекса. По-видимому, этот комплекс сходен со стабильным комплексом ацил—фермент, образованным трипсином и его ингибитором из поджелудочной железы (разд. 8.12). Антитромбин III ингибирует также факторы свертывания IX_a, X_a и XI_a. Ингибитор-

Таблица 8.2. **Факторы свертывания крови**

Фактор	Механизм	Функция активной формы
Фактор Хагемана (фактор XII)	Внутренний	Активируют фактор XI
Калликреин	»	
Кинин	»	
Предшественник плазменного тромбопластина (ППТ) (фактор XI)		Активирует фактор IX
Кристмас-фактор (фактор IX)	»	Оба необходимы для активации фактора X
Антигемофильный фактор (фактор VIII)		
Тканевой фактор	Внешний	То же
Проконвертин (фактор VII)	»	
Фактор Стюарта (фактор X)	Общий	Активирует фактор II
Акцелерин (фактор V)	»	Стимулирует активацию фактора II
Протромбин (фактор II)	»	Активирует фибриноген (фактор I)
Фибриноген (фактор I)	»	ОБРАЗУЕТ ФИБРИНОВЫЙ СГУСТОК
Фибрин-стабилизирующий фактор (фактор XIII)	»	Стабилизирует сгусток путем образования поперечных связей в фибрине

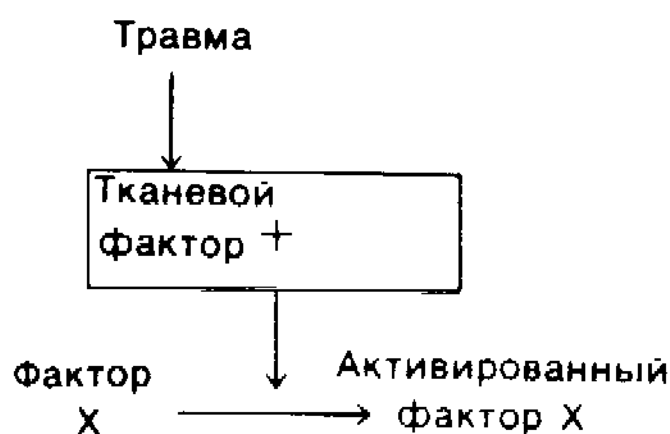


Рис. 8.38. Внешний механизм свертывания крови.

ное действие антитромбина III усиливается в присутствии *гепарина* - отрицательно заряженного полисахарида (разд. 9.16), синтезируемого тучными клетками, расположенными вблизи стенок кровеносных сосудов. Гепарин действует как *антикоагулянт*, увеличивая скорость необратимого комплексообразования между тромбином и антитромбином III.

Заключение

Активация белков в результате протеолитического расщепления одной или нескольких пептидных связей - широко распространенный механизм регуляции в биологических системах. Если белок в активированной форме является ферментом, то его неактивный предшественник называется проферментом (или зимогеном). Наиболее изученный процесс активации профермента - это превращение химотрипсиногена в химотрипсин, происходящее следующим путем. Под действием трипсина пептидная связь между остатками 15 и 16 в молекуле химотрипсиногена разрывается и в результате образуется химотрипсин. Возникшая при этом новая концевая аминогруппа изолейцина-16 загибается внутрь молекулы белка, где электростатически связывается с аспартатом-194. Это взаимодействие служит пусковым механизмом для ряда локальных изменений конформации, конечный результат которых - формирование кармана для связывания ароматических (либо больших неполярных) боковых цепей субстрата. Кроме того, формируется полость оксианиона, стабилизирующая переходное состояние.

Критическая роль в механизме каталитического действия химотрипсина принадлежит остатку серина (серин-195) с высокой реакционной способностью. На первом этапе гидролиза пептидного субстрата происходит этерификация карбоксильного компонента субстрата с гидроксильной группой серина-195, приводящая к образованию ковалентно связанного *промежуточного продукта ацил—фермент*. Этот промежуточный продукт гидролизуется на втором этапе катализа. Ключевую роль как в ацилировании, так и в деацилировании фермента играет также гистидин-57. На деле серин-195 становится сильным нуклеофильным агентом в результате формирования ряда водородных связей: он соединяется водородной связью с гистидином-57, который в свою очередь соединяется водородной связью с аспартатом-102, расположенным в глубине молекулы. В итоге эти три остатка составляют *систему переноса заряда*, ускоряющую катализ примерно в 10^3 раз. Такая же система переноса заряда имеется в трипсине, эластазе и тромбине. Все эти ферменты подобны химотрипсину по аминокислотной последовательности, конформации и механизму каталитического действия, но отличаются от него по специфичности. Такие вариации на одну тему, видимо, результат происхождения от общего предшественника и последующей дивергентной эволюции. Три других основных типа протеолитических ферментов - это цинксодержащие, тиоловые и карбоксипротеиназы.

Активация проферментов играет также ведущую роль в регуляции свертывания крови. Поразительная особенность процесса свертывания состоит в том, что он организован как каскад превращений проферментов, в котором активированная форма одного фактора свертывания катализирует активацию следующего. Свертывание крови происходит в результате взаимодействия двух последовательностей реакций, получивших название внешнего и внутреннего механизмов. Оба механизма необходимы для нормального свертывания крови. Они сливаются в общий механизм, приводящий к формированию фибринового сгустка. Фибрин образуется из фибриногена, высокорастворимого белка плазмы, путем гидролиза четырех пептидных связей между остатками аргинина и глицина. Катализирует эту реакцию тромбин - фермент, сходный с трипсином. В результате гидролиза от фибриногена отщепляются два А-пептида и два В-пептида, на долю которых приходится около 3% молекулы фибриногена. Образующийся в результате мономер фибрина спонтанно полимеризуется в длинные

нерастворимые нити фибрина. Сгусток фибрина стабилизируется далее ковалентными поперечными связями, образующимися в результате реакции трансамидирования между боковыми цепями специфических остатков глутамина и лизина. Для карбоксилирования остатков глутамата в протромбине и некоторых других факторах свертывания необходим витамин K. Связывание ионов Ca^{2+} γ-карбоксиглутаматом способствует прикреплению протромбина к мембранам тромбоцитов, что ведет к ускорению активации протромбина факторами X_a и V.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Stroud R.M., 1974. A family of protein-cutting proteins, Sci. Amer., **231** (1), 24-88. (Прекрасное изложение общих представлений о структуре, каталитических свойствах и эволюции сериновых протеиназ.)

McKusick V.A., 1965. The royal hemophilia, Sci. Amer., **213** (2), 88-95.

Сериновые протеиназы и их проферменты

Blow D.M., 1976. Structure and mechanism of chymotrypsin, Acc. Chem. Res., **9**, 145-152.

Huber R., *Bode W.*, 1978. Structural basis of the activation and action of trypsin, Acc. Chem. Res., **11**, 114-122.

Kraut J., 1977. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis, Ann. Rev. Biochem., **46**, 331-358.

Stround R.M., *Kossiakoff A.A.*, *Chambers J.L.*, 1977. Mechanisms of zymogen activation, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., **6**, 177-193.

Boyer P.D. (ed.), 1971. The Enzymes (3rd ed.), vol. 3, Academic Press. (Указанный том включает много прекрасных статей о протеолитических ферментах, их проферментах и ингибиторах.)

Кислые протеиназы и их проферменты

Tang J., 1976. Pepsin and pepsinogen: models for carboxyl (acid) proteases and their zymogens, Trends Biochem. Sci., **1**, 205-208.

Ингибиторы трипсина

Laskowski M., *Jr.*, *Kato I.*, 1980. Protein inhibitors of proteinases, Ann. Rev. Biochem., **49**, 593-626.

Ruhlmann A., *Kukla D.*, *Schwager P.*, *Bartels K.*, *Huber R.*, 1973. Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor, J. Mol. Biol., **89**, 73-101.

Sweet R.M., *Wright H.T.*, *Janin J.*, *Chothia C.H.*, *Blow D.M.*, 1974. Crystal structure of the complex of porcine trypsin with soybean trypsin inhibitor (Kunitz) at 2,6-Å resolution, Biochemistry, **13**, 4212-4228.

Протеиназы в биологических процессах

Reich E., *Rifkin D.B.*, *Shaw E.* (eds.), 1975. Proteases and Biological Control, Cold Spring Harbor Laboratory. (Великолепный сборник статей, посвященный роли протеиназ в разнообразных биологических процессах, в частности в оплодотворении, миграции клеток, распространении опухолей, морфогенезе и метаморфозе.)

Fong D., *Bonner J.T.*, 1979. Proteases in cellular slime mold development: evidence for their involvement, Proc. Nat. Acad. Sci., **76**, 6481-6485.

Свертывание крови

Jackson C.M., *Nemerson Y.*, 1980. Blood coagulation, Ann. Rev. Biochem., **49**, 765-811.

Ratnoff O.D., 1978. Hereditary disorders of hemostasis. In: Stanbury J.B., Wyngaarden J.B. and Fredrickson D.S. (eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease (4th ed.), pp. 1755-1791, McGraw-Hill.

Davie E.W., *Hanahan D.J.*, 1977. Blood coagulation proteins. In: Putnam F.W. (ed.), The Plasma Proteins (2nd ed.), pp. 422-544, Academic Press.

Ogston D., *Bennett B.* (eds.), 1977. Haemostasis: Biochemistry, Physiology, and Pathology, Wiley.

Stenflo J., *Suttie J.W.*, 1977. Vitamin K-dependent formation of γ-carboxyglutamic acid, Ann. Rev. Biochem., **46**, 157-172.

Link K.P., 1943. The anticoagulant from spoiled sweet clover hay, Harvey Lectures, **39**, 162-216. (Увлекательный отчет об открытии дикумарола и его антикоагулянтном действии.)

Doolittle R.F., 1973. Structural aspects of the fibrinogen to fibrin conversion, Advan. Protein Chem., **27**, 1 109.

Tonney N.M., *Cohen C.*, 1977. Crystalline states of a modified fibrinogen, J. Mol. Biol., **110**, 363-385.

Massie R.K., 1967. Nicholas and Alexandra, Dell. (Занимательное изложение, касающееся взаимосвязи между гемофилией и некоторыми событиями русской истории.)

Вопросы и задачи

1. Сравните *лизоцим*, *карбоксипептидазу А* и *химотрипсин*.

а) Для активности какого из этих ферментов необходим ион металла?

б) Какой из этих ферментов образован только одной полипептидной цепью?

в) Какой из этих ферментов быстро инактивируется в присутствии диизопропилфторфосфата?

г) Какой из этих ферментов образуется путем протеолитического расщепления определенного профермента?

2. Перенос протона от фермента на субстрат–нередко ключевой этап катализа.

а) Имеет ли место этот этап при катализе

12-665

химотрипсином, лизоцимом и карбоксипептидазой А?

б) Если да, то определите донор водорода в каждом случае.

3. Часто бывает так, что нуклеофильная группа фермента атакует молекулу субстрата. Какая группа служит нуклеофильным агентом при катализе химотрипсином и карбоксипептидазой А?

4. Перечислите факторы, обусловливающие каталитическую силу ферментов.

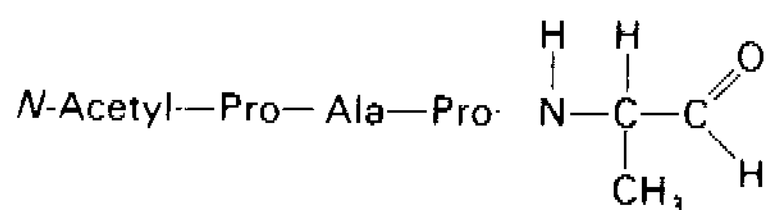
5. ТФХК (тозил-α-фенилаланинхлорметилкетон) используется в качестве аффинной метки химотрипсина. Он инактивирует химотрипсин путем алкилирования гистидина-57.

а) Предложите аффинную метку для трипсина, сходную с ТФХК.

б) Как определить ее специфичность?

в) Какая еще сериновая протеиназа может инактивироваться при использовании такой аффинной метки трипсина?

6. Специфическим ингибитором эластазы служит альдегидное производное одного из ее субстратов:

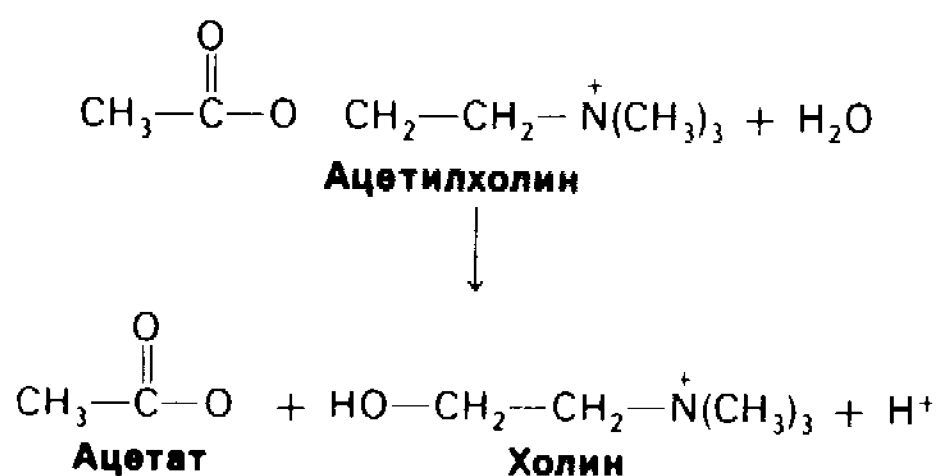


Этот альдегид – аналог промежуточного соединения, образующегося при катализе эластазой.

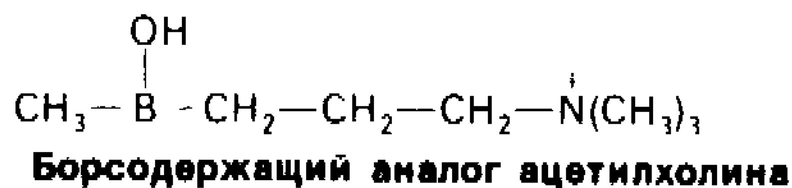
а) С каким остатком в активном центре эластазы ковалентно свяжется этот альдегид в первую очередь?

б) Какого типа ковалентная связь сформируется при этом?

7. Борсодержащие кислоты представляют собой еще один тип аналогов переходного состояния для ферментов, образующих в качестве промежуточных продуктов ацил-ферментные комплексы. Ацетилхолинэстераза – фермент, гидролизующий эфирную связь в ацетилхолине:



Ацетилхолинэстераза специфически ингибируется следующим борсодержащим аналогом ацетилхолина:



Каким образом этот борсодержащий аналог может присоединиться к активному центру ацетилхолинэстеразы?

8. Для синтеза фактора X, как и для синтеза протромбина, необходим витамин K. Фактор X так же, как и протромбин, содержит остатки γ-карбоксиглутамата в N-концевой части. Однако в активированном факторе X в отличие от тромбина эта часть молекулы сохраняется. К каким функциональным последствиям может привести это различие между двумя активированными факторами?

9. Антитромбин III образует нераспадающийся комплекс с тромбином, но не с протромбином. Чем это можно объяснить?

10. Фибрин, подобно миозину, кератину и эпидермину, состоит из стержневидных структур, образованных переплетающимися α-спиралями. Эти α-спирализованные суперспирали (разд. 2.9) содержат повторяющиеся гептапептидные единицы (*a b c d e f g*) с гидрофобными остатками *a* и *d*. Можете ли вы объяснить, чем обусловлена такая регулярность структуры?

ГЛАВА 9.
Белки соединительной ткани: коллаген, эластин и протеогликаны

Все многоклеточные организмы содержат коллаген, представляющий собой семейство фибриллярных белков. Особенно много коллагена у млекопитающих, где на его долю приходится четвертая часть всех белков. Коллаген является основным фибриллярным элементом кожи, костей, сухожилий, хряща, кровеносных сосудов, зубов. В этом или ином количестве он содержится почти во всех органах, и именно он объединяет клетки в определенные структурные единицы. Помимо этой «структурной» роли в сформировавшихся тканях коллаген играет организующую роль в развивающихся тканях. *Отличительным свойством коллагена является его способность к формированию нерастворимых фибрилл, обладающих высокой упругостью* (рис. 9.1). Более того, структура коллагеновых волокон зависит от типа ткани и соответствует ее специализации. Охарактеризованы четыре типа коллагена (табл. 9.1).

Таблица 9.1. Типы коллагена[1]

Тип	Состав	Распределение
I	$[\alpha1(I)]_2\alpha2$	Кожа, сухожилия, кости, роговица глаза
II	$[\alpha1(II)]_3$	Хрящ, межпозвоночные диски, стекловидное тело
III	$[\alpha1(III)]_3$	Кожа эмбриона, сердечно-сосудистая система
IV	$[\alpha1(IV)]_3$	Базальная мембрана

[1] В настоящее время охарактеризовано пять типов коллагена, и, учитывая наличие разных молекулярных форм в пределах одного типа (например, коллаген типа I имеет состав $[\alpha1(I)]_2\alpha2$ либо $[\alpha1(I)]_3$), считают, что существует не менее 10 молекулярных форм коллагена. *Прим. перев.*

Коллаген – слово происходит от греческого выражения «производить клей».

9.1. Тропоколлаген как основная структурная единица коллагена

Нерастворимость коллагена на протяжении многих лет служила препятствием для изучения его химических свойств. Положение изменилось лишь после того, как обнаружилось, что коллаген из тканей молодых животных можно экстрагировать в растворимом виде, поскольку на этом этапе в нем относительно мало поперечных связей. Отсутствие ковалентных поперечных связей в незрелом коллагене позволяет выделить основную структурную единицу, названную *тропоколлагеном.*

Молекулярная масса тропоколлагена составляет около 285 кДа; он состоит из *трех полипептидных цепей* одинакового размера. Состав цепей зависит от типа коллагена (табл. 9.1). Коллаген типа I, содержащийся в организме в наибольшем количестве, состоит из двух цепей одного типа, обозначаемых α1 (I), и третьей цепи, обозначаемой α2. Коллагены других типов состоят из трех идентичных цепей. Каждая из трех нитей коллагена включает около 1000 аминокислотных остатков. Таким образом, основная структурная единица коллагена имеет очень большие размеры, в частности она более чем в 10 раз больше химотрипсина.

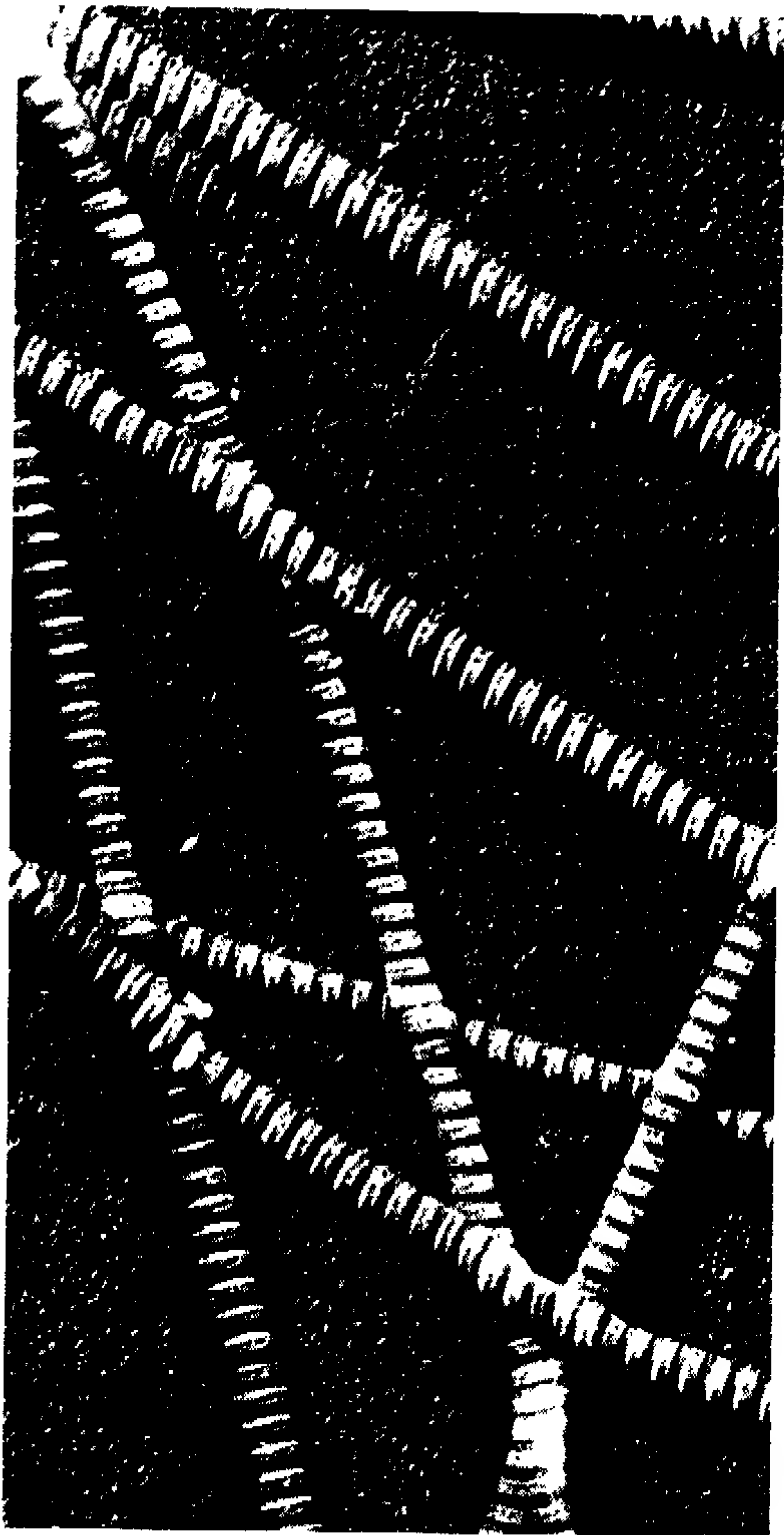


Рис. 9.1. Электронная микрофотография интактных коллагеновых волокон кожи. Препарат напылен хромом. Периодичность структуры по оси волокна составляет 640 Å. (Печатается с любезного разрешения д-ра J. Gross.)

9.2. Коллаген обладает необычным составом и необычной последовательностью аминокислот

В молекуле коллагена примерно 1/3 аминокислотных остатков приходится на *глицин*, что необычайно много для белков. В гемоглобине, например, содержание глицина составляет только 5% общего содержания аминокислот. Количество *пролина* в коллагене также значительно выше, чем в большинстве других белков. Наконец, в коллагене имеются две аминокислоты, крайне редко встречающиеся в других белках, а именно *гидроксипролин* и *гидроксилизин:*



4-Гидроксипролин (Hyp)



5-Гидроксилизин (Hyl)

Последовательности аминокислотных остатков в коллагене свойственна высокая степень регулярности: *почти каждый третий остаток – это глицин;* часто повторяются участки глицин-пролин-гидроксипролин (рис. 9.2). В этом отношении коллаген отличается от глобулярных белков, которым несвойственна регулярность последовательности аминокислот; помимо коллагена этим свойством обладают фиброин шелка и эластин.

9.3. Некоторые остатки пролина и лизина в коллагене гидроксилируются

Гидроксипролин и гидроксилизин не включаются в состав полипептидной цепи коллагена в процессе синтеза белка. Если ввести

13 -	-Pro-Met-	-Pro-Ser-	-Pro-Arg-
22 -	-Leu-Hyp-	-Pro-Hyp-	-Ala-Hyp-
31 -	-Pro-Gln-	-Phe-Gln-	-Pro-Hyp-
40 -	-Glu-Hyp-	-Glu-Hyp-	-Ala-Ser-
49 -	-Pro-Met-	-Pro-Arg-	-Pro-Hyp-
58 -	-Pro-Hyp-	-Lys-Asn-	-Asp-Asp-

Рис. 9.2. Последовательность аминокислот в части цепи αl (I) коллагена. На протяжении более чем 1000 остатков каждым третьим остатком является глицин.



Рис. 9.3. Гидроксилирование остатка пролина по С-4 под действием пролилгидроксилазы – фермента, активирующего молекулярный кислород.

крысе ^{14}C-гидроксипролин, то в новосинтезированном коллагене радиоактивности не обнаружится. Однако при введении ^{14}C-пролина гидроксипролин в коллагене окажется радиоактивным. Следовательно, пролин, но не экзогенный гидроксипролин служит предшественником гидроксипролиновых остатков в коллагене.

Определенные остатки пролина в коллагене превращаются в гидроксипролин под действием *пролилгидроксилазы* – фермента, содержащего в активном центре атом железа (в ферроформе). Донором атома кислорода, присоединяющегося к С-4 пролина, служит O_2. Второй атом кислорода из молекулы O_2 включается в сукцинат, образующийся из второго обязательного субстрата этой реакции – α-оксоглутарата (рис. 9.3). Таким образом, пролилгидроксилаза является *диоксигеназой*. Примечательная особенность этой реакции гидроксилирования состоит в том, что для ее осуществления необходим *восстановительный агент*, а именно *аскорбиновая кислота* (разд. 9.8), благодаря которой сохраняется ферроформа атома железа.

Рассматриваемая реакция гидроксилирования высокоспецифична. Свободный пролин не может служить субстратом реакции. Гидроксилированию подвергаются специфические участки довольно большой, но еще не спирализованной полипептидной цепи. *Гидроксилированию по С-4 подвергаются только те остатки пролина, которые расположены со стороны аминогруппы глицинового остатка.* Помимо этого, несколько остатков пролина гидроксилируется по С-3 другими ферментными системами, причем эти пролины всегда расположены с карбоксильной стороны глициновых остатков.

Под действием *лизилгидроксилазы* происходит гидроксилирование по С-5 небольшой части остатков лизина в коллагене. Как и при гидроксилировании пролина, в процессе участвуют молекулярный кислород, α-оксоглутарат и аскорбиновая кислота. Подвергающиеся гидроксилированию остатки лизина всегда расположены со стороны аминогруппы остатков глицина.

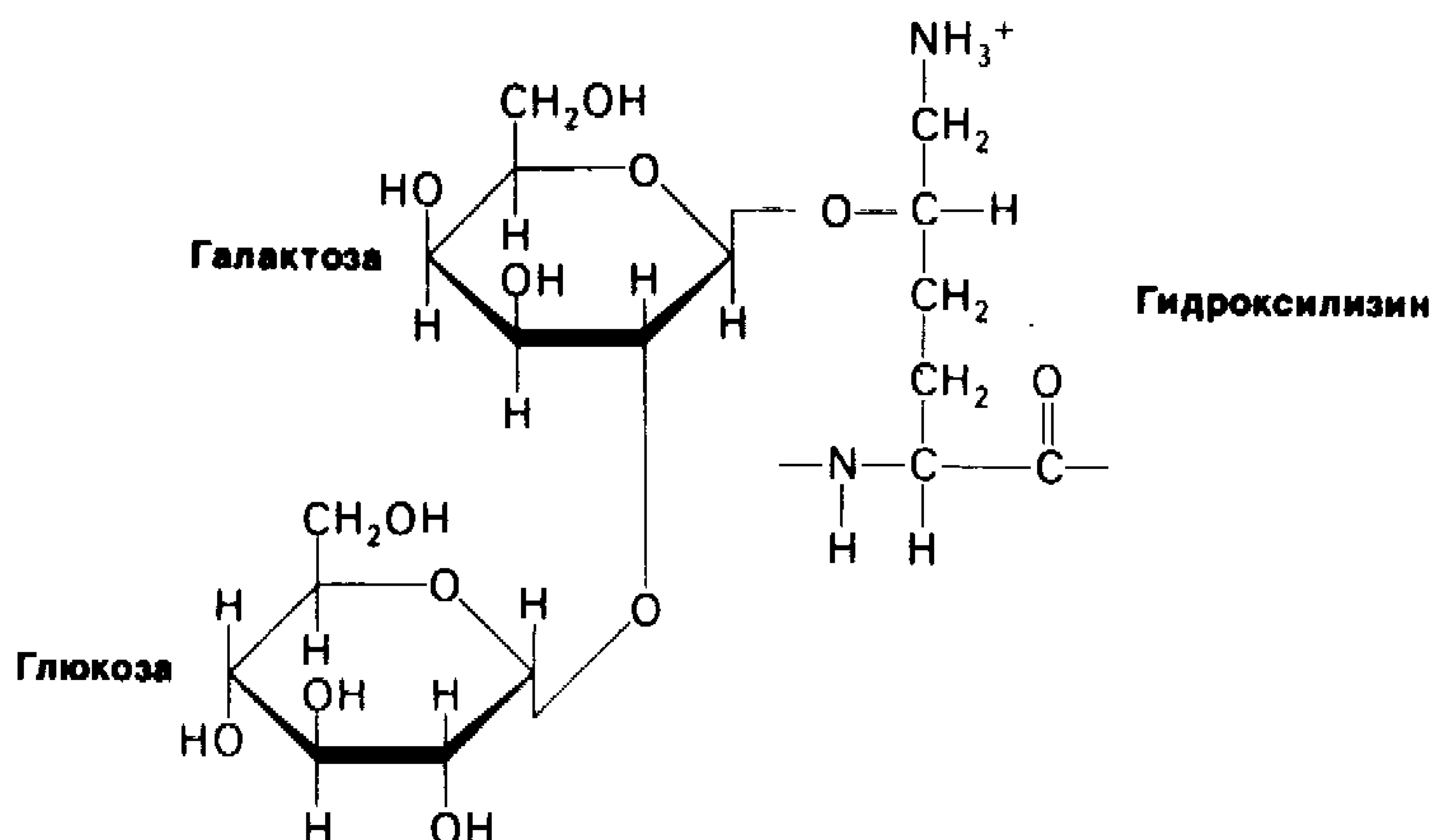


Рис. 9.4. Углеводные компоненты коллагена.

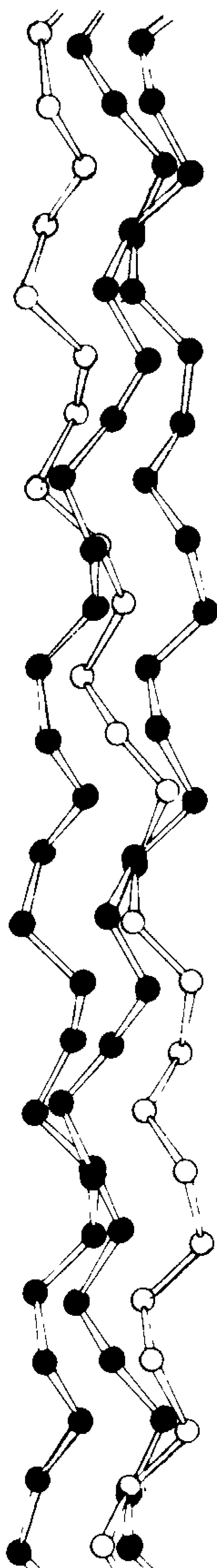


Рис. 9.5. Модель тройной спирали коллагена. Показаны только α-углеродные атомы.

9.4. К остаткам гидроксилизина присоединены сахара

В коллагене содержатся углеводные единицы, ковалентно связанные с остатками гидроксилизина. Чаще всего это дисахарид глюкозы и галактозы (рис. 9.4). Присоединение сахаров происходит в результате последовательного действия *галактозилтрансферазы* и *глюкозилтрансферазы*. Эти ферменты гликозилирования специфичны в отношении остатков гидроксилизина в новосинтезированном коллагене, еще не претерпевшем спирализации. Число углеводных единиц в тропоколлагене зависит от вида ткани. Так, например, в коллагене сухожилий (тип I) это число равно 6, а в коллагене капсулы хрусталика (тип IV) – 110.

9.5. Структура тропоколлагена – это тройной спирально скрученный тяж

Обратимся к конформации основной структурной единицы коллагенового волокна типа I.

Как показали электронно-микроскопические и гидродинамические исследования, *тропоколлаген имеет форму стержня длиной 3000 Å и диаметром 15 Å*. Это один из самых длинных среди известных белков. Для сравнения укажем, что по длине тропоколлаген в 60 раз больше диаметра химотрипсина, а по диаметру – в 2 с лишним раза меньше. Каждая из трех полипептидных цепей имеет форму спирали (рис. 9.5). Кроме того, эти три спирализованные цепи закручиваются относительно друг друга, образуя тугую нить. И действительно, коллагеновое волокно обладает удивительной прочностью: для разрыва волокна диаметром 1 мм нужна сила в 10 кг.

Характер спирализации каждой из цепей в трехцепочечной нити коллагена хорошо

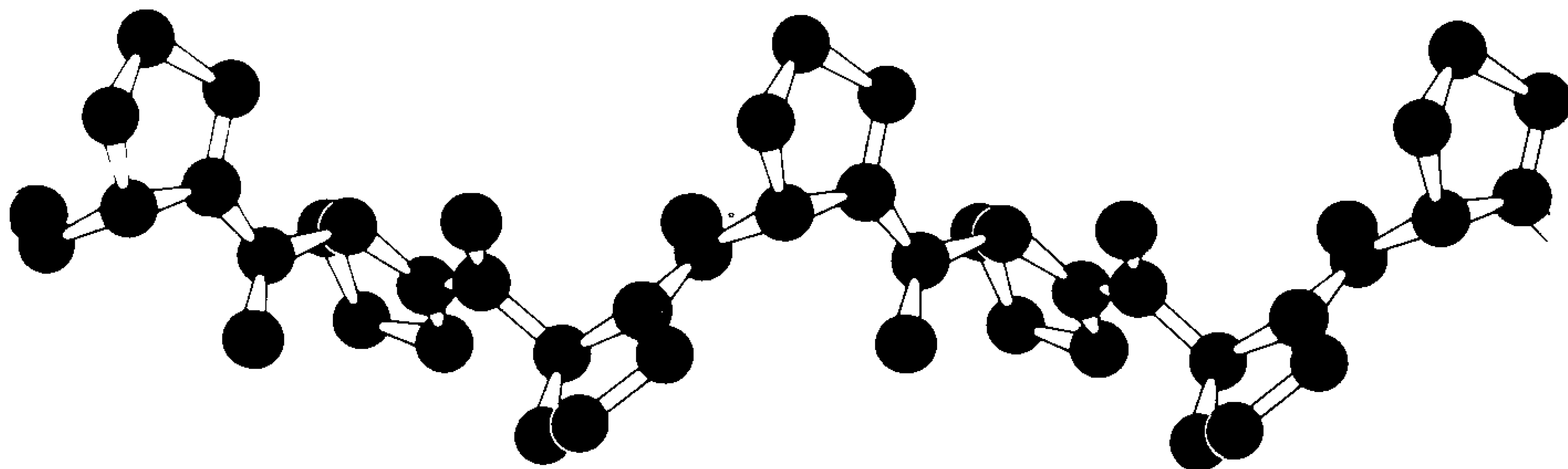


Рис. 9.6. Модель спирали поли-L-пролина (*транс*-спираль типа II).

Такая же спираль составляет основу пространственной структуры каждой из трех цепей тропоколлагена.

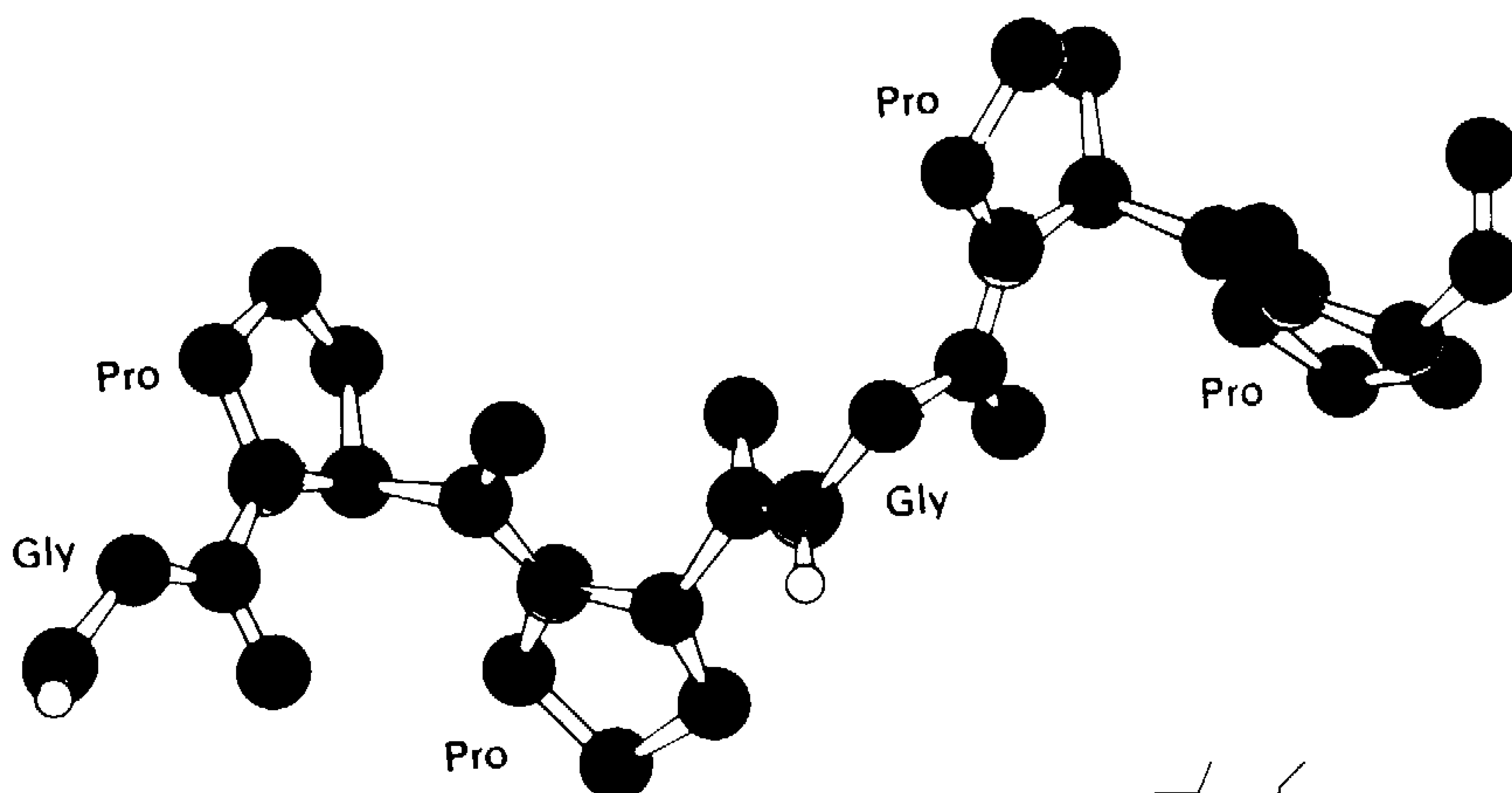
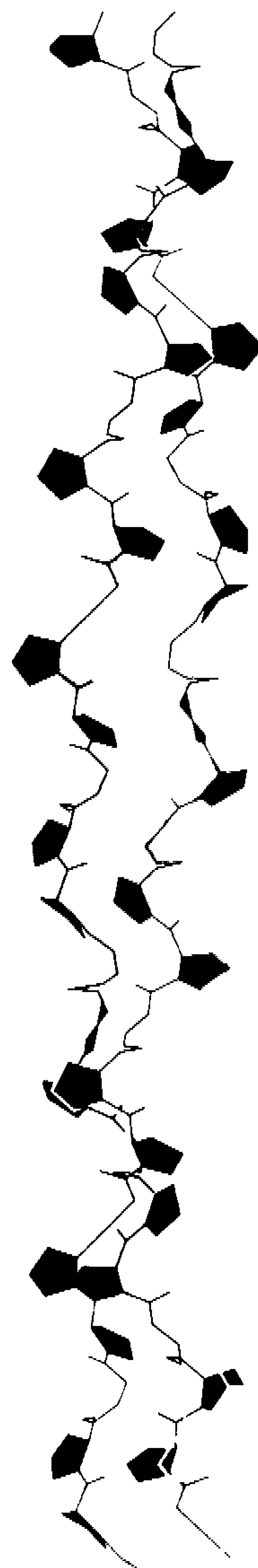


Рис. 9.7. Конформация отдельной цепи в тройной спирали коллагена. Изображен участок цепи с последовательностью -Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro.



виден на примере модельного соединения *поли-L-пролина.* Этот синтетический полипептид имеет спиральную форму (рис. 9.6), совершенно отличную от α-спирали. В нем отсутствуют водородные связи. Вместо них *стабилизацию спирали обеспечивают силы стерического отталкивания пирролидоновых колец в остатках пролина.* При спирализации полипептидной цепи пирролидоновые кольца располагаются как можно дальше друг от друга, образуя так называемую *транс*-спираль типа II, структура которой оказывается гораздо более развернутой по сравнению с туго закрученной α-спиралью. Расстояние между двумя аминокислотными остатками по оси спирали поли-L-пролина составляет 3,12 Å, тогда как в α-спирали оно равно 1,5 Å. На поворот спирали в поли-L-пролине приходится три аминокислотных остатка.

Рассмотрим теперь конформацию отдельной цепи в трехцепочечной спирали коллагена (рис. 9.7). Каждая цепь спирализована аналогично поли-L-пролину. Далее три спирализованные цепи закручиваются одна вокруг другой, образуя *суперспираль* (рис. 9.8). Расстояние между двумя аминокислотными остатками по оси спирали со-

Рис. 9.8. Скелетная модель тройной спирали коллагена. Показана повторяющаяся последовательность -Gly-Pro-Pro.

ставляет 2,9 Å, а на один виток спирали приходится почти 3,3 остатка. *Три цепи связаны между собой водородными связями.* Донорами водорода служат пептидные NH-группы остатков глицина, а акцепторами – пептидные СО-группы аминокислотных остатков на других цепях. Водородные связи направлены поперечно к длинной оси тропоколлагенового тяжа. В образовании водородных связей, стабилизирующих тройную спираль, участвуют также гидроксильные группы остатков гидроксипролина и молекулы воды. Пространственная модель тройной спирали коллагена показана на рис. 9.9.

9.6. Малые размеры глицина делают его незаменимым компонентом структуры

Теперь мы можем поставить вопрос: почему каждое третье положение в аминокислотной последовательности тропоколлагена занято глицином? Во внутреннем пространстве тройного спирального волокна очень тесно (рис. 9.10). По существу, *кроме глицина ни один аминокислотный остаток не мог бы уместиться внутри тройной спирали.* Поскольку на один оборот спирали приходится три аминокислотных остатка, соответственно каждый третий остаток в каждой из цепей неизбежно глицин. Два остатка по обе стороны от глицина оказываются с наружной стороны тройной спирали, где легко размещаются громоздкие кольца остатков пролина и гидроксипролина.

Казалось бы, из всех аминокислот глицин – наименее важная, так как его боковая цепь – это всего лишь один атом водорода. Однако в организации белковой структуры такая простота может оказаться достоинством. Глицин играет очень важную роль именно потому, что он мал и, занимая очень мало места, не препятствует соединению полипептидных цепей друг с другом. Мы уже сталкивались с этим, рассматривая миоглобин и гемоглобин, где глицин инвариантно стоит в положении B6, способствуя сближению спиралей B и E. В химотрипсине в полости, где происходит связывание субстрата, может уместиться большая ароматическая группа только потому, что два остатка, выстилающие полость,– это остатки глицина. В эволюции переносчика электронов цитохрома *c* самым консервативным аминокислотным остатком оказался глицин. В коллагене мы вновь сталкиваемся с тем, что *глицин играет особо важную роль, расширяя диапазон возможных конформаций при скручивании полипептидной цепи.*



Рис. 9.9. Пространственная модель тройной спирали коллагена. (Печатается с любезного разрешения д-ра A. Rich.)

9.7. Стабильность спирали коллагена зависит от кооперативных взаимодействий

Если раствор тропоколлагена нагреть, то при характеристической температуре происходит изменение его физических свойств (рис. 9.11). Так, резко падает вязкость раствора, что указывает на потерю волокнистой структуры. Судя по изменению оптического вращения, исчезает спиральность структуры отдельных цепей. Отсюда следует, что тепловое движение преодолевает те силы, которые стабилизируют тройную спираль, и в результате возникает разорванная структура – желатин, имеющий конфигурацию статистического клубка. Этот структурный переход возникает дискретно, при определенной температуре, аналогично тому, как происходит плавление кристалла.

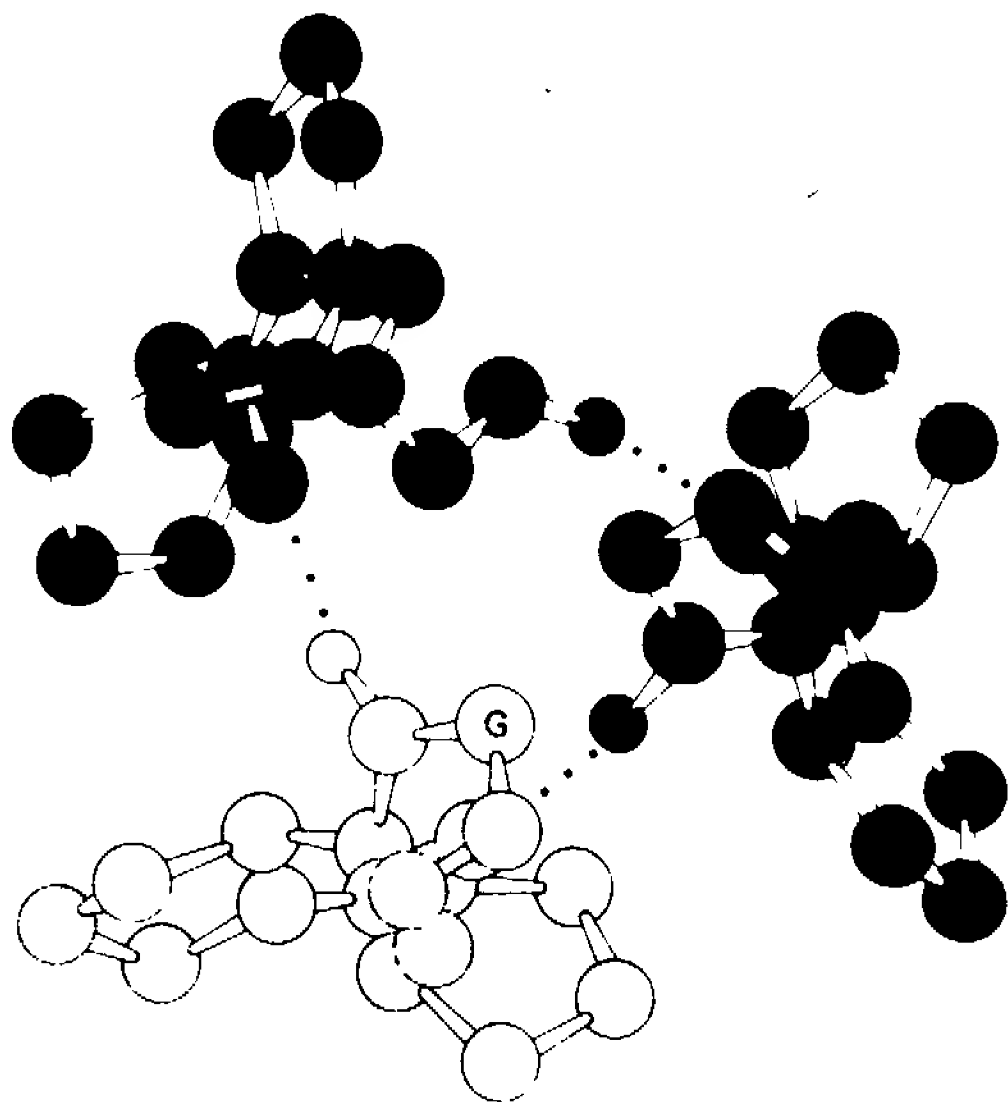


Рис. 9.10. Поперечный срез через модель коллагена. Каждая цепь соединена водородной связью с двумя другими цепями (точки означают водородную связь). α-Углеродный атом остатка глицина в каждой цепи обозначен буквой G. Каждым третьим остатком в последовательностях аминокислот должен быть глицин, так как вблизи оси (центра) спирали не остается места для более крупного остатка. Обратите внимание, что пирролидоновые кольца расположены снаружи. Различные цепи тройной спирали показаны разным цветом.

Перешедший в биохимию термин «плавление» стал применяться в случаях, когда потеря высокоорганизованной структуры происходит в узких температурных пределах. Спираль тропоколлагена характеризуется высокой степенью упорядоченности по длине. Дискретность структурного перехода при повышении температуры указывает на то, что стабилизация тройной спирали обусловлена *кооперативными взаимодействиями*. Другими словами, спирализация обусловлена образованием *множества усиливающих друг друга связей*, каждая из которых сама по себе относительно слаба. Образование каждой из этих стабилизирующих связей в большой степени зависит от того, образуются ли одновременно и соседние связи. Примером такой кооперативной структуры может служить застежка-молния. В последующих главах мы рассмотрим ряд других высококооперативных макромолекулярных структур: ДНК, вирусы, клеточные мембраны.

Таблица 9.2. Зависимость термостабильности коллагена от содержания иминокислот

Источник	Количество пролина + гидроксипролина (в расчете на 1000 остатков)	Термостабильность $T_{сж}$	Термостабильность $T_{пл}$	Температура тела, °С
Кожа теленка	232	65	39	37
Кожа акулы	191	53	29	24–28
Кожа трески	155	40	16	10–14

Температура, при которой спирализованность структуры утрачивается наполовину, называется *температурой плавления* ($T_{пл}$). $T_{пл}$ тропоколлагена служит критерием стабильности его тройной спирали. Для интактных коллагеновых фибрилл сопоставимым показателем является *температура сжатия* $T_{сж}$. Коллагены различных видов организмов различаются по температуре плавления. Оказалось, что $T_{пл}$ и $T_{сж}$ коллагенов связаны с температурой тела животного (табл. 9.2). Самой низкой $T_{пл}$ характеризуются коллагены корюшки, тогда как у теплокровных $T_{пл}$ достигает наиболее высоких значений. Различия в термостабильности коррелируют с содержанием иминокислот (пролина и гидроксипролина) в коллагене. *Чем выше содержание имино-*

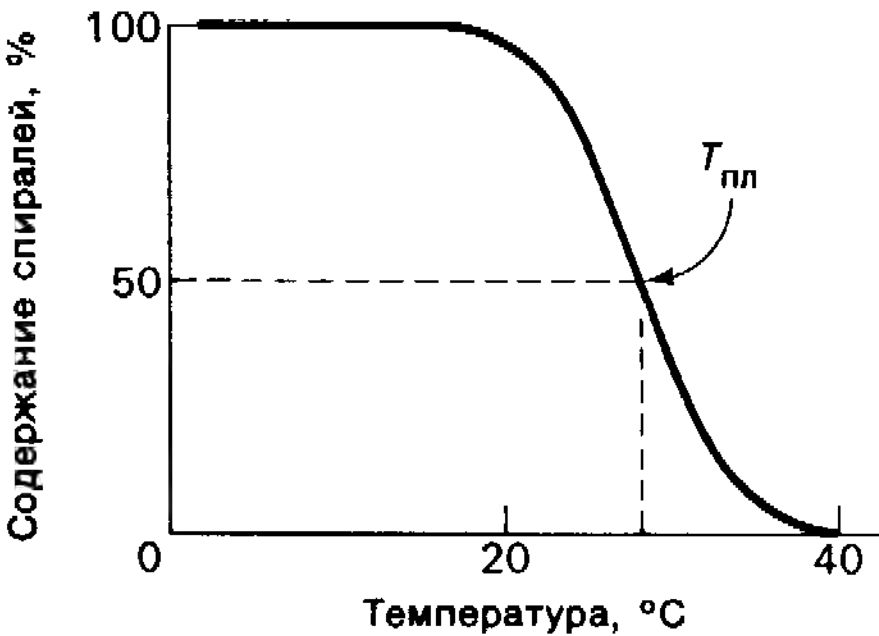


Рис. 9.11. Кривая плавления молекулы коллагена.

кислот, тем стабильнее коллагеновая спираль. Содержание иминокислот в коллагене увеличивалось в процессе эволюции от холоднокровных к теплокровным.

Итак, стабильность спирали отдельной цепи тропоколлагена зависит от пролина и гидроксипролина, действующих в качестве замков. Далее тройная спираль стабилизируется поперечными водородными связями и вандерваальсовыми взаимодействиями между остатками на разных цепях. Наличие глицина в каждом третьем положении последовательности аминокислот служит стерическим разрешением для существования суперспирали.

Определение температуры плавления химически синтезированных полипептидных моделей коллагена пролило свет на биологическое значение процесса гидроксилирования пролина. Так, обнаружилось, что $T_{пл}$ poly(Pro-Pro-Gly) составляет 24°C, тогда как $T_{пл}$ poly(Pro-Hyp-Gly) равна 58°C; отсюда следует, что *гидроксилирование значительно увеличивает стабильность тройной спирали.* Этот вывод подтверждается результатами изучения негидроксилированного коллагена, полученного путем инкубации клеток сухожилия с αα′-бипиридилом – соединением, образующим хелатное соединение с железом и потому ингибирующим пролилгидроксилазу. Синтезированный этими клетками негидроксилированный коллаген не образует тройной спирали при 37°C, но быстро спирализуется при температуре ниже 24°C.

9.8. Нарушение гидроксилирования – один из биохимических дефектов при цинге

Значение гидроксилирования коллагена со всей очевидностью выступает при *цинге.* Жак Картье (J. Cartier) в 1536 г. очень живо описал эту болезнь, поразившую его спутников во время путешествия по реке Св. Лаврентия:

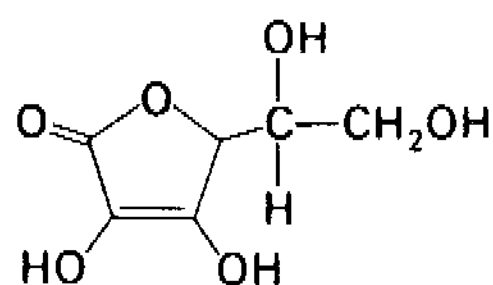
> «Одни лишились всех своих сил и не могли стоять на ногах... У других к тому же появились на коже багровые пятна крови, которые постепенно покрывали голени, колени, бедра, ягодицы, плечи, руки, шею. Изо рта стал идти зловонный запах, десны так загнили, что отпало все мясо до корней зубов, а сами зубы почти все выпали».

Способы предупреждения цинги были в сжатой форме сформулированы английским врачом Джеймсом Линдом (J. Lind), который писал в 1753 г.:

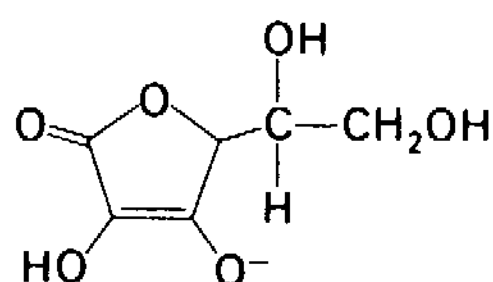
> «Не раз уже убеждались в том, что зелень, свежие овощи и спелые фрукты – не только лучшее лекарство, но и самое действенное средство для предупреждения этой болезни».

Линд настаивал, чтобы в рацион моряков входил лимонный сок. Британское Адмиралтейство прислушалось к его совету примерно через 40 лет.

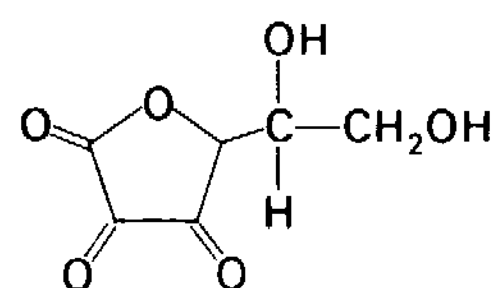
Цинга обусловлена недостаточностью аскорбиновой кислоты (витамина C) в пище. Приматы и морские свинки утратили способность синтезировать аскорбиновую кислоту и поэтому должны получать ее с пищей. Являясь сильным восстановительным агентом, аскорбиновая кислота (рис. 9.12) предохраняет от инактивации пролилгидроксилазу, видимо, поддерживая восстановленное состояние атома железа



Аскорбиновая кислота



Аскорбат-ион



Дегидроаскорбиновая кислота

Рис. 9.12. Формулы аскорбиновой кислоты (витамина C) и ее ионизированной формы – аскорбат-иона. pK_a кислотных гидроксильных групп аскорбиновой кислоты равно 4,2. Дегидроаскорбиновая кислота является окисленной формой аскорбат-иона.

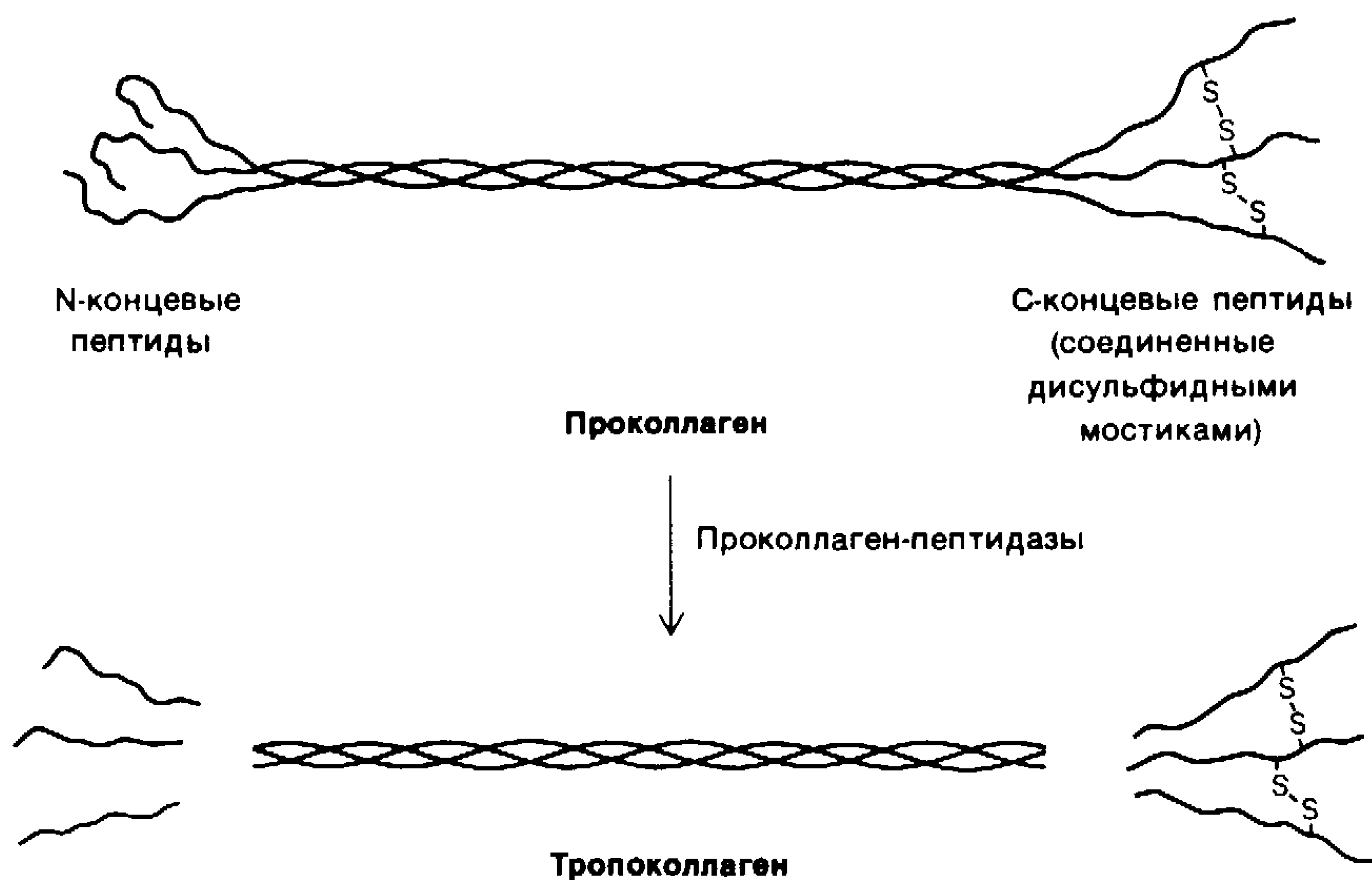


Рис. 9.13. Схематическое изображение превращения проколлагена в коллаген путем отщепления N-концевого пептида (около 15 кДа) и С-концевого пептида (около 30 кДа) от каждой из трех цепей. В проколлагене С-концевые пептиды трех цепей связаны между собой дисульфидными мостиками.

в ферменте. Коллаген, синтезируемый в отсутствие аскорбиновой кислоты, оказывается недогидроксилированным и, следовательно, имеет пониженную температуру плавления. Такой коллаген не может образовать нормальные по структуре волокна, что и приводит к поражению кожи и ломкости сосудов, столь четко выраженных при цинге.

9.9. Проколлаген предшественник коллагена при его биосинтезе

Тройная спираль коллагена типа I in vivo формируется очень быстро. Однако in vitro процесс образования тройной спирали из растворенных цепей α1 (I) и α2 длится днями и к тому же имеет низкий выход. Чем же объясняется это различие в сборке тропоколлагеновой спирали in vivo и in vitro? Вспомним для сравнения, как восстанавливается структура денатурированного химотрипсиногена и химотрипсина: денатурированный профермент спонтанно принимает правильную трехмерную конфигурацию, тогда как фермент к этому не способен. Дело в том, что в химотрипсине отсутствует часть структуры, необходимой для возникновения правильной трехмерной конфигурации, а именно два дипептида, которые отщепляются в процессе активации.

По аналогии можно предположить, что неспособность очищенных цепей α1 (I) и α2 к спонтанному образованию правильной тропоколлагеновой структуры обусловлена отсутствием каких-то элементов, несущих необходимую информацию. Так оно и есть на самом деле. *Составляющие коллаген цепи синтезируются в виде предшественников большей массы.* Предшественник α1 (I)-цепи, называемый *про-α1 (I)*, имеет массу 140 кДа (тогда как масса α1 (I)-цепи – 95 кДа). Дополнительные пептиды локализуются как на N-, так и на С-конце про-α1 (I)-цепи (рис. 9.13). Подобным же образом предшественником α2-цепи служит *про-α2* с массой 140 кДа. По аминокислотному составу дополнительные пептидные участки в про-α1 (I) и про-α2 совершенно не похожи на основную часть цепи. В них мало глицина, пролина и гидроксипролина. N-концевые пептиды в про-α1 (I) и про-α2 содержат внутрицепочечные дисульфидные связи. Более того, *С-концевые пептиды этих цепей-предшественников связаны межцепочечными дисульфидными связями, отсутствующими в коллагене.*

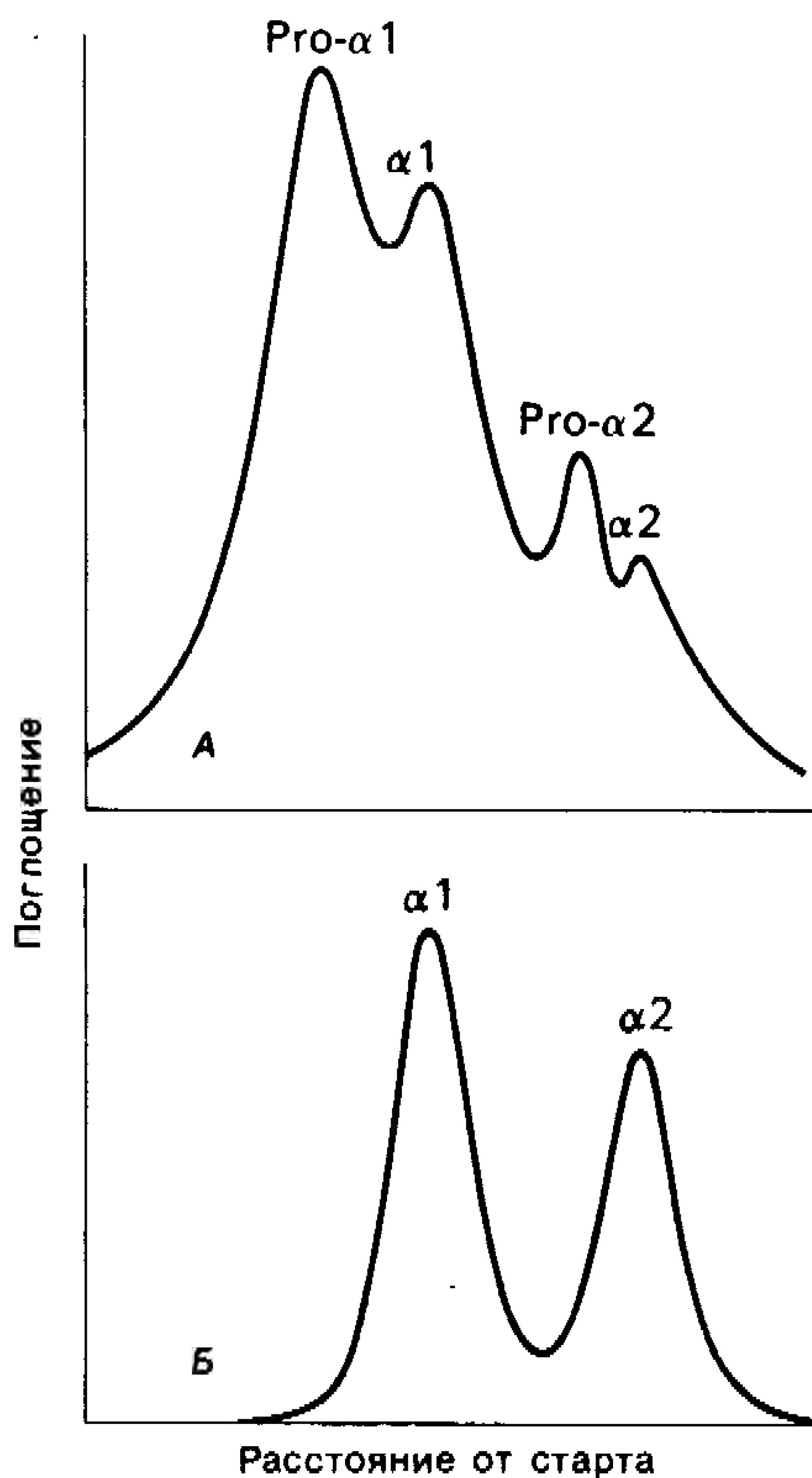


Рис. 9.14. Электрофоретическое разделение экстракта кожи в полиакриламидном геле. В кислых экстрактах кожи больных с синдромом Элерса-Данлоса типа VII (*А*) присутствует значительное количество проколлагена (про-α1 и про-α2). В норме (*Б*) проколлаген отсутствует. [Lichtenstein J. R., Martin G. R., Kohn L. D., Byers P. H., McKusick V. A., Science, **182**, 299 (1973).]

9.10. Дополнительные пептиды цепей-предшественников отщепляются ферментативно

Цепи про-α1 (I) и про-α2 синтезируются фибробластами и секретируются в межклеточное пространство соединительной ткани. Здесь дополнительные пептиды, стоящие на N- и С-концах этих цепей-предшественников, отщепляются специфическими протеолитическими ферментами – *проколлаген-пептидазами.*

Нарушение превращения цепей-предшественников в α1- и α2-цепи приводит к генерализованному повреждению соединительной ткани. Так, например, больные *с синдромом Элерса–Данлоса* отличаются малым ростом, повышенной растяжимостью кожи и избыточной гибкостью суставов. При одной из форм этого заболевания в экстрактах кожи и сухожилий больных обнаруживается значительное количество проколлагенов (рис. 9.14). Одновременно в фибробластах выявляется снижение проколлаген-пептидазной активности. Известно также наследственное (наследуемое по рецессивному типу) заболевание крупного рогатого скота – *дерматоспараксис,* которое обусловлено отсутствием проколлаген-пептидазы. Кожа животных в этом случае становится крайне хрупкой, так как нити коллагена находятся в ней в виде дезорганизованных пучков. При этом значительная часть имеющегося зрелого коллагена типа I содержит α1 (I)- и α2-цепи с сохранившимися N-концевыми пептидами проколлагена. Все изложенное показывает, что отщепление N-концевых пептидов необходимо для формирования упорядоченных коллагеновых фибрилл.

9.11. Коллагеновое волокно состоит из ступенчато расположенных молекул тропоколлагена

Образование коллагенового волокна происходит во внеклеточном пространстве в результате спонтанного, специфического соединения между собой тропоколлагеновых фибрилл. Структура коллагенового волокна была изучена методами рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии. Коллагеновое волокно имеет поперечную исчерченность с интервалом 680 Å (см. рис. 9.1). В то же время длина молекулы тропоколлагена составляет 3000 Å. Таким образом, период структуры волокна в несколько раз меньше, чем длина составляющих волокно молекул; это показывает, что ряды молекул тропоколлагена не могут лежать точно друг над другом. И в самом деле, один ряд тропоколлагенов смещен по отношению к соседнему ряду примерно на 1/4 длины молекулы. Отсюда следует, что *основу структурной организации коллагенового волокна составляют сдвинутые на четверть ступенчато расположенные параллельные ряды тропоколлагеновых молекул* (рис. 9.15). Такая «аранжировка» напоминает музыкальную фугу (рис. 9.16).

Любопытная структурная особенность

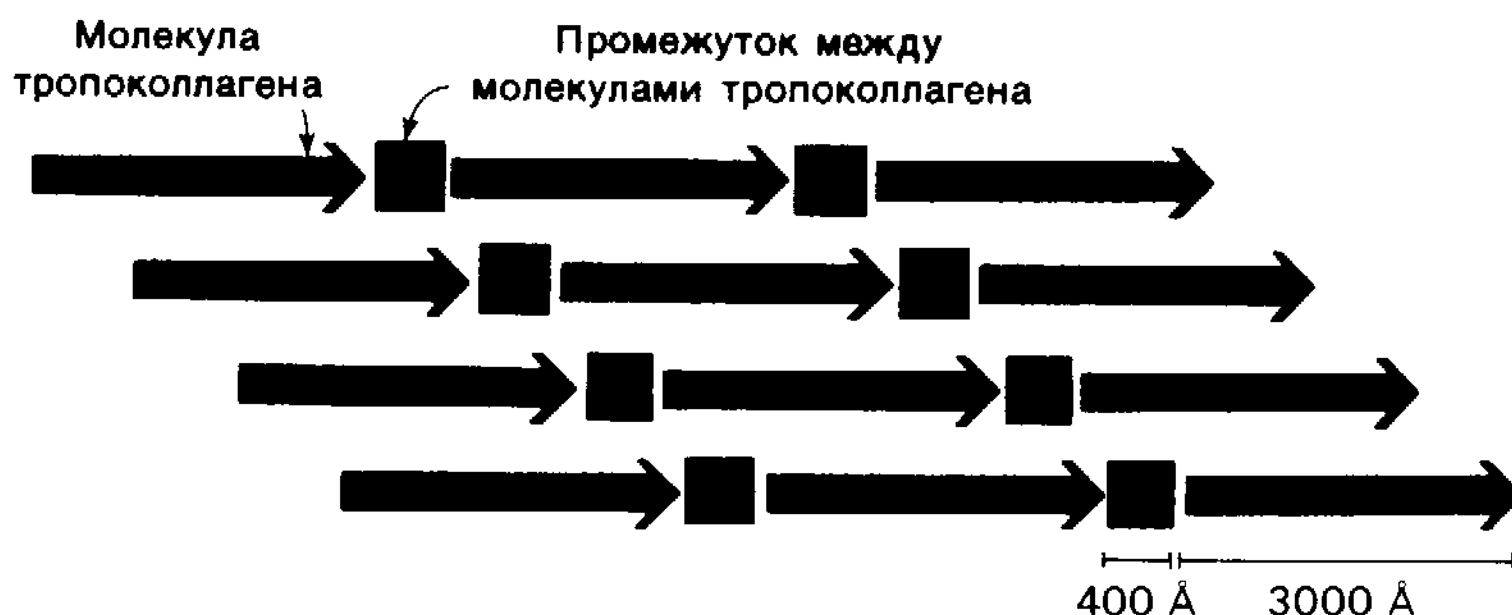


Рис. 9.15. Схематическое изображение структурной организации коллагенового волокна. Молекулы тропоколлагена (показаны синими стрелками) расположены рядами, последовательно смещенными на 1/4 одна по отношению к другой. Промежутки в рядах между молекулами тропоколлагена (показаны красными квадратами) могут служить центрами кальцификации при формировании кости.

волокна состоит в том, что расположенные в ряд молекулы тропоколлагена не связаны «конец в конец». Между концом одной молекулы и началом следующей имеется промежуток около 400 Å (рис. 9.15). Этот промежуток играет особую роль при *формировании кости*. Кость состоит из органической фазы, почти целиком представленной коллагеном, и неорганической, а именно фосфата кальция. Последний по своему строению близок к гидроксиапатиту с составом $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Коллаген необходим для образования кости как место отложения кристаллов фосфата кальция. Оказалось, что первые кристаллы откладываются с интервалом порядка 680 Å, что совпадает с периодом коллагенового волокна. Вполне вероятно, что промежутки вдоль ряда молекул тропоколлагена выполняют роль *центров отложения* минеральных составных частей кости.

9.12. Образование коллагенового волокна регулируется проколлаген-пептидазами

Молекулы проколлагена в отличие от тропоколлагена не способны к спонтанному образованию волокна: для этого необходимо предварительное отщепление N- и C-концевых пептидов. Таким образом, *формирование коллагеновых волокон аналогично формированию нитей фибрина.* Проколлаген аналогичен фибриногену, тропоколлаген – мономерам фибрина, а проколлаген-пептидазы – тромбину. В обеих системах условием образования волокна является специфическое протеолитическое расщепление.

Фибробласты секретируют проколлаген, но не тропоколлаген (рис. 9.17). Механизмы биосинтеза и секреции аналогичны тем, которые действуют в случае проферментов поджелудочной железы (разд. 8.1) и других секреторных белков (разд. 29.29). Коллагеновое волокно формируется во внеклеточной жидкости вблизи поверхности фибробласта, но не внутри него, поскольку проколлаген-пептидазы находятся вне клетки. Концевые пептиды в цепях-предшественниках препятствуют несвоевременному формированию волокна. Возможно также, что они участвуют в переносе проколлагена через мембрану фибробласта. На более раннем внутриклеточном этапе эти дополни-
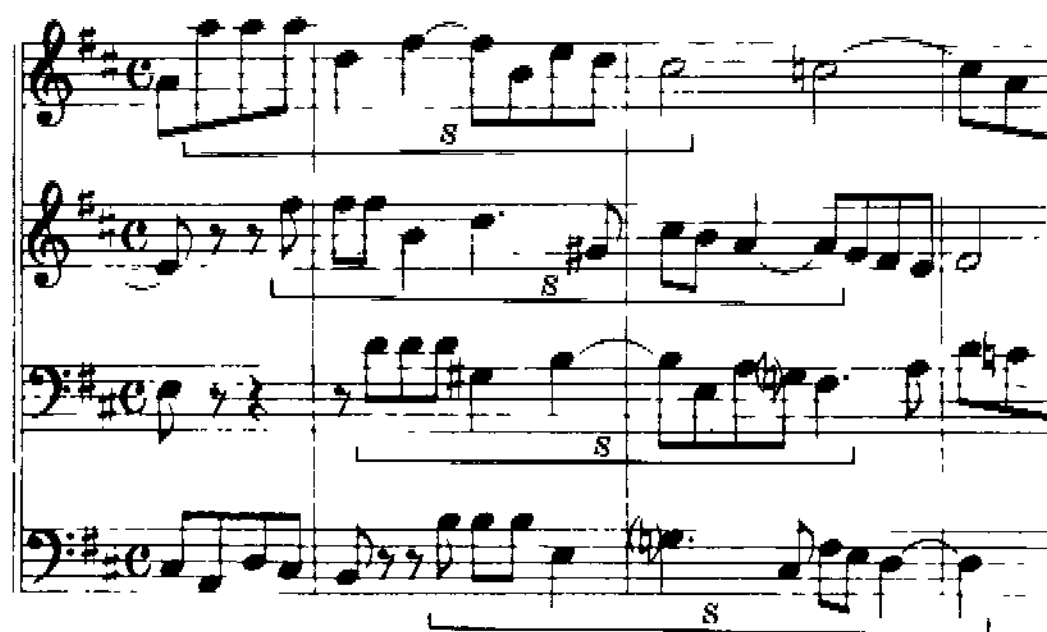


Рис. 9.16. Пассаж из фуги D-мажор, «Хорошо темперированный клавир» И.С. Баха. (Erickson R., The structure of music: a listener's guide, Noonday Press, 1955, p. 130.)

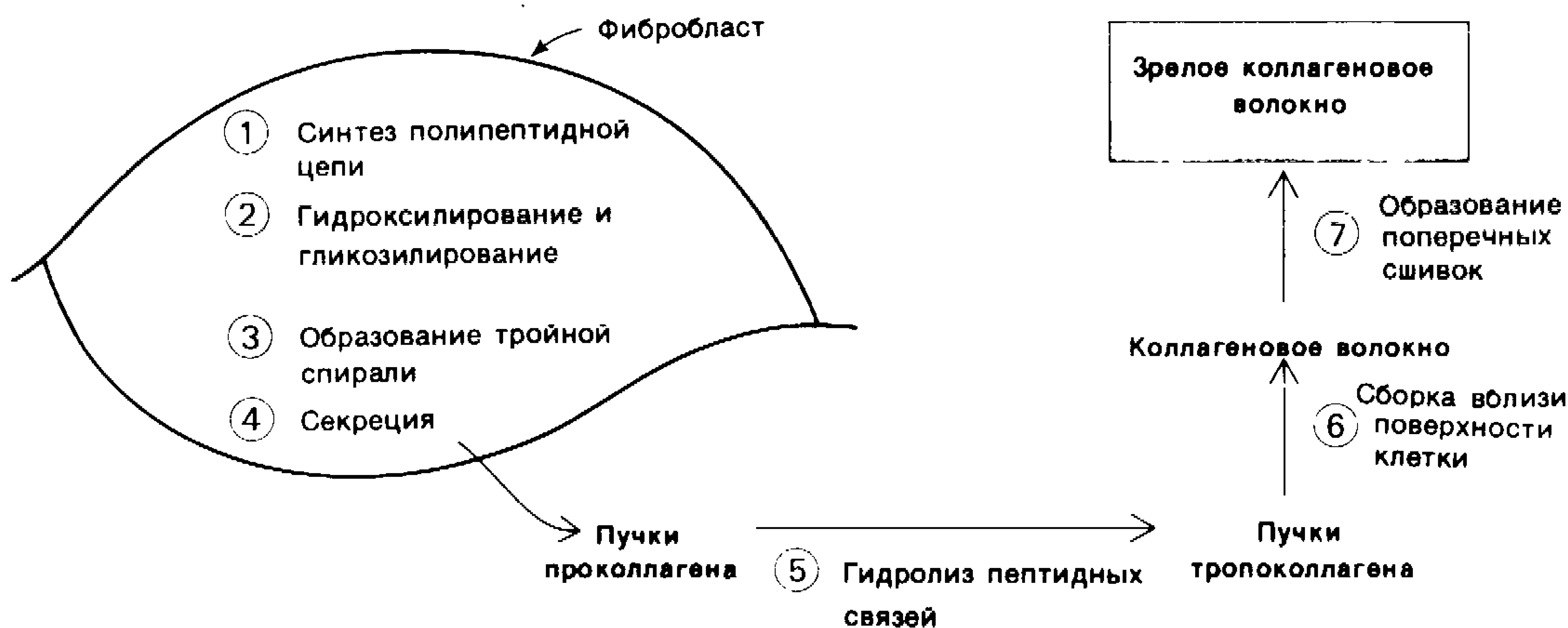


Рис. 9.17. Этапы формирования зрелого коллагенового волокна.

тельные пептиды способствуют взаимной ориентации и соединению трех цепей для последующего образования тройной спирали. Особое значение при этом имеют межцепочечные дисульфидные связи.

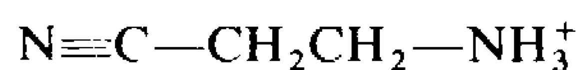
9.13. Поперечные связи повышают прочность коллагенового волокна

Коллаген, подобно фибрину, стабилизирован ковалентными поперечными связями. Коллагеновым волокнам свойственно два типа поперечных связей: внутримолекулярные (в пределах одной тропоколлагеновой единицы) и межмолекулярные (между отдельными тропоколлагеновыми единицами). Рассматриваемые связи встречаются только в двух близких белках – коллагене и эластине.

В образовании внутримолекулярных поперечных связей в коллагене участвуют боковые цепи лизина. На первом этапе происходит превращение ε-аминоконца лизина в альдегид под действием фермента лизилоксидазы. Далее два альдегида вступают в реакцию *альдольной конденсации* (рис. 9.18). При этой реакции енолат-ион, образовавшийся из одного альдегида, присоединяется к карбонильной группе другого альдегида. Интересна локализация этой внутримолекулярной поперечной связи. В последовательности аминокислот аминоконцевого участка α1 (I)-цепи коллагена глицин становится каждым третьим остатком, лишь начиная с положения 13. Следовательно, лизин-5 находится в неспирализованной области полипептидной цепи, вблизи начала тройной спирали. Гибкость этого неспирализованного фрагмента способствует формированию рассматриваемой поперечной связи.

Альдольная поперечная связь может превращаться – в результате взаимодействия с боковой цепью гистидина в гистидин-альдольную поперечную связь (рис. 9.19). Альдегидная группа этого альдоль-гистидинового комплекса способна давать шиффово основание с другой боковой цепью, такой, как боковая цепь гидроксилизина. В итоге возможно ковалентное связывание четырех боковых цепей друг с другом, причем некоторые из этих цепей могут принадлежать разным молекулам тропоколлагена (рис. 9.20).

Количество и тип поперечных связей в коллагене зависят от функции и возраста ткани. Так, коллаген ахиллесова сухожилия крысы характеризуется большим количеством поперечных связей, а в коллагене более эластичного сухожилия хвоста их гораздо меньше. Значение поперечных связей, придающих волокнам коллагена высокую степень упругости, ясно выступает при *латиризме* – заболевании животных, вызванном поеданием семян сладкого горошка *Lathyris odoratus*. Токсическим агентом в этом случае является *β-аминопропионитрил*, подавляющий превращение боковой



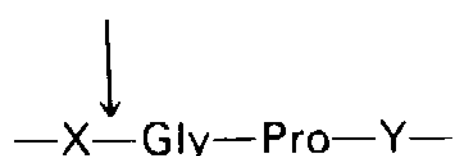
β-Аминопропионитрил

цепи лизина в альдегид. Под действием этого токсина коллаген заболевших животных теряет механическую прочность.

9.14. Коллагеназы – ферменты, специфически расщепляющие коллаген

Коллагеназа – это фермент, расщепляющий пептидные связи в определенных участках спирализованных областей коллагена. В отношении других ферментов коллаген проявляет очень высокую степень устойчивости. Известны два типа коллагеназ.

1. Один тип коллагеназ синтезируется некоторыми микроорганизмами. Так, *Clostridium histolyticum* (бактерия, вызывающая *газовую гангрену*) выделяет коллагеназу, расщепляющую полипептидную цепь коллагена более чем в 200 участках. Фермент гидролизует следующую связь:



Эта коллагеназа, *разрушающая соединительнотканные барьеры организма-хозяина*, способствует проникновению (инвазии) высокопатогенного клостридия в организм. Сама бактерия не содержит коллагена и потому не подвержена действию коллагеназы.

2. Второй тип – это *тканевые коллагеназы*, которые обнаруживаются у земноводных и млекопитающих в растущих или подвергающихся метаморфозу тканях. Впервые коллагенолитическая активность была выявлена в хвостовом плавнике головастиков в период метаморфоза (рис. 9.21), когда в течение нескольких дней происходит резорбция больших количеств коллагена в ткани. Для определения коллагенолитической активности маленькие кусочки подвергающегося метаморфозу хвостового плавника культивировали на слое коллагеновых волокон. Спустя несколько часов на этом непрозрачном слое появились совершенно прозрачные зоны, что указывало на высокую активность коллагеназы (рис. 9.22). Коллагенолитическая активность выявляется также в таких тканях млекопитающих, которые претерпевают быструю реорганизацию, например в матке после родов. Совершенно ясно, что время

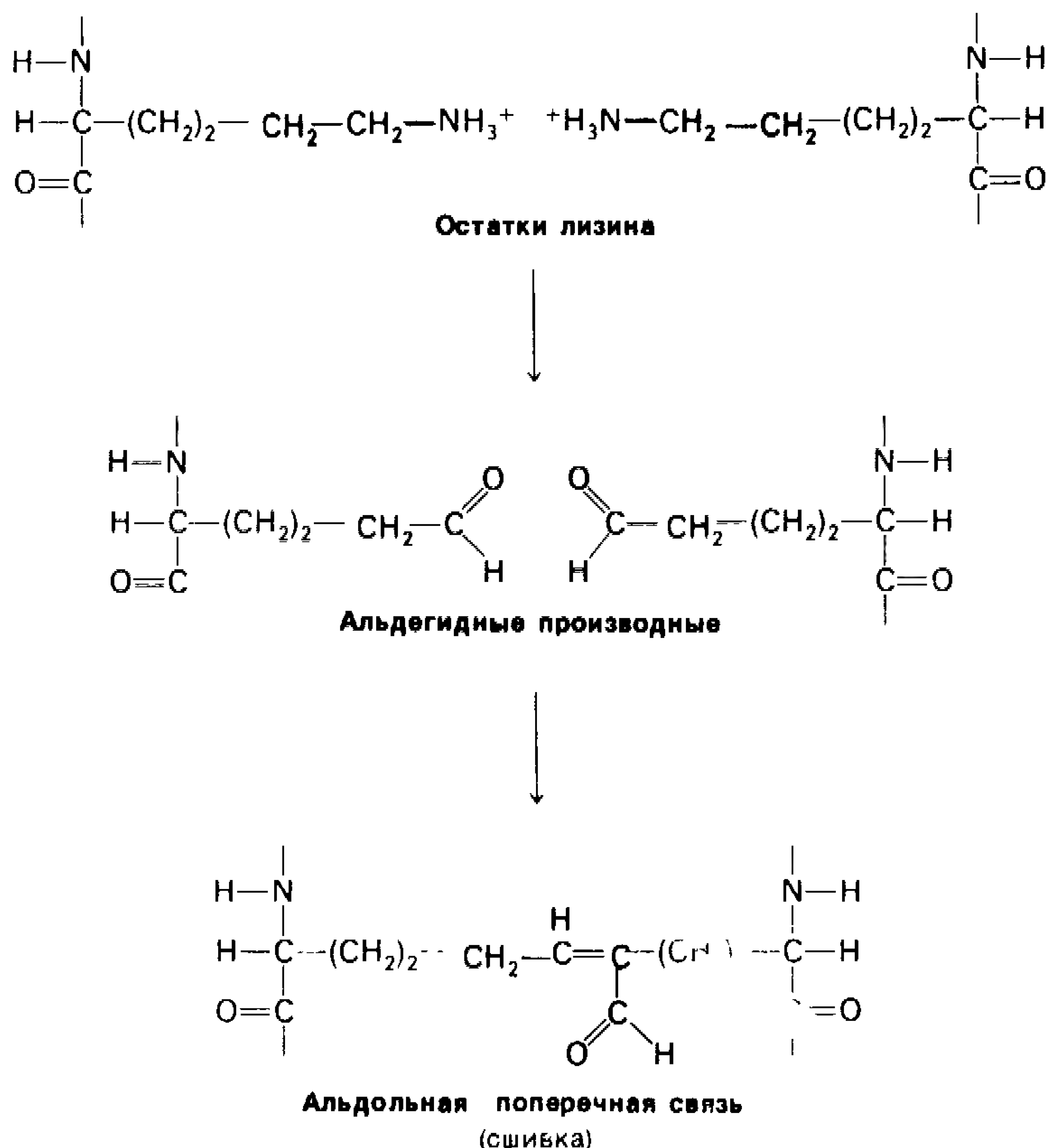


Рис. 9.18. Образование альдольной поперечной сшивки из двух боковых цепей лизина.

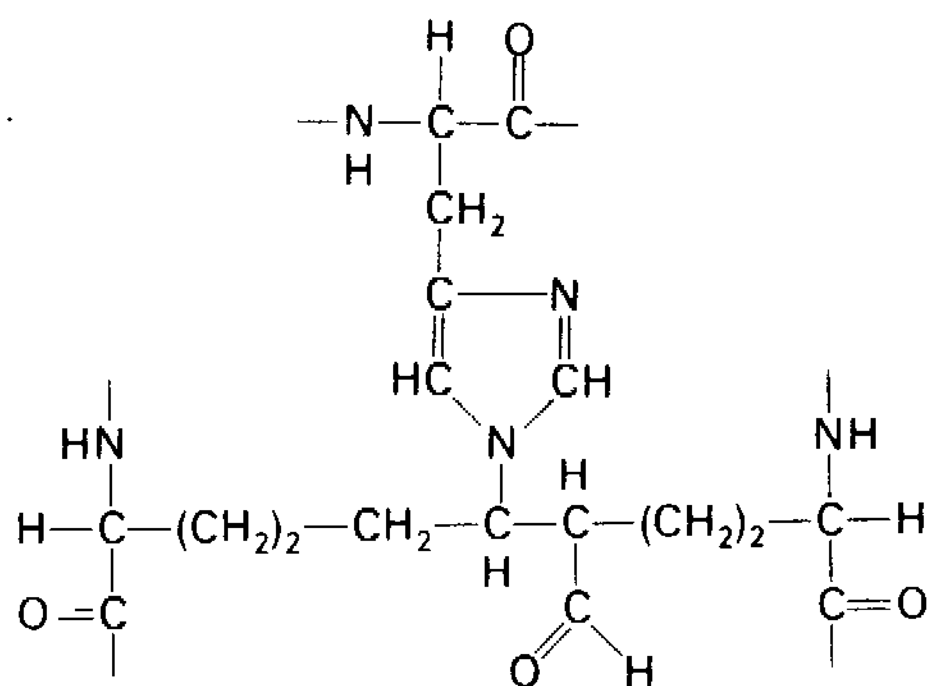


Рис. 9.19. Боковая цепь гистидина может присоединяться по месту двойной связи C=C в альдольной сшивке, при этом образуется гистидин-альдольная поперечная сшивка.

и сила действия тканевых коллагеназ должны находиться под строгим контролем.

Коллагеназа головастика обладает удивительной спицифичностью. Этот фермент расщепляет тропоколлаген, как бы делая срез через все три цепи в единственном месте – вблизи от аминокислотного остатка 750 в последовательности из 1000 остатков. Два фрагмента, составляющие соответственно 1/4 и 3/4 исходной цепи, при температуре тела спонтанно развертываются и становятся доступными действию других протеолитических ферментов.

9.15. Эластин – каучукоподобный белок эластических волокон

Эластин обнаруживается в большинстве типов соединительной ткани наряду с коллагеном и полисахаридами. *Это основной компонент эластических волокон, обладающий способностью растягиваться в несколько раз в длину, а при снятии нагрузки быстро восстанавливать исходную форму и размер.* Эластин находится в большом количестве в стенках кровеносных сосудов, особенно в дуге аорты, расположенной около сердца, и в связках. Очень богаты эластином эластические шейные связки травоядных животных. В коже, сухожилиях и рыхлой соединительной ткани эластина относительно мало.

Очень своеобразен аминокислотный состав этого белка. Как и в коллагене, одна треть аминокислотных остатков представлена глицином. Эластин богат также пролином. Однако в отличие от коллагена в эластине очень мало гидроксипролина, нет гидроксилизина и мало полярных аминокислот; эластин богат неполярными алифатическими аминокислотами – аланином, валином, лейцином и изолейцином.

В зрелом эластине много поперечных связей. По этой причине он практически нерастворим; это затрудняет его изучение. Однако из тканей свиней, *страдающих дефицитом меди*, удалось выделить *растворимый предшественник эластина*, называемый *проэластином*. При дефиците меди блокируется образование альдегидов, необходимых для образования поперечных связей в эластине (как и в коллагене). Изучение аминокислотного состава проэластина, имеющего массу 125 кДа, еще не закончено, однако уже получены некоторые интересные результаты. Так, установлено существование нескольких областей белка, обогащенных остатками лизина и аланина. Часто встречаются такие последовательности:

-Lys-Ala-Ala-Lys-

и

-Lys-Ala-Ala-Ala-Lys-

Именно в этих участках образуются поперечные связи. Обнаруженные в коллагене альдольные поперечные связи (рис. 9.18) имеются и в эластине. В обоих белках встре-

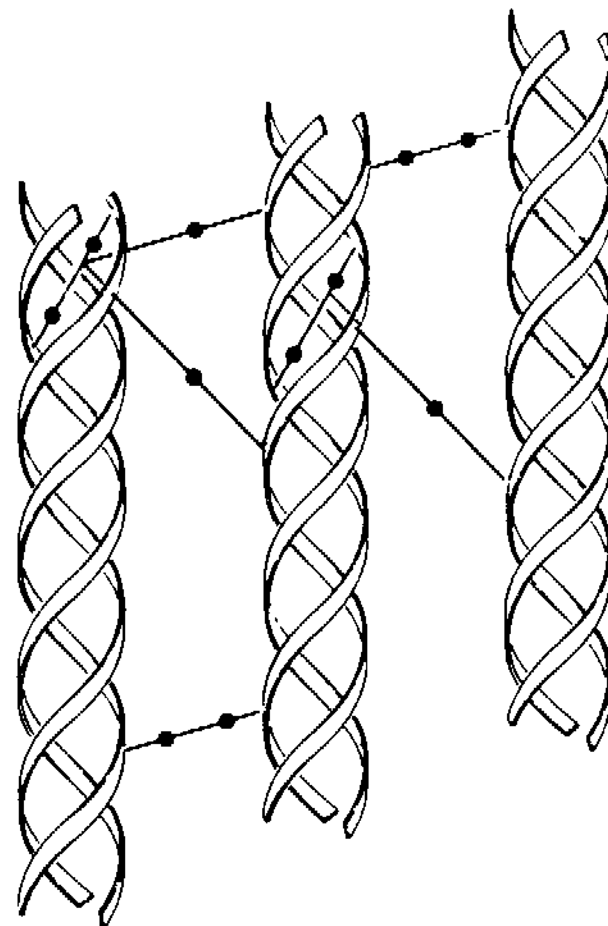


Рис. 9.20. Внутри- и межмолекулярные поперечные связи в коллагене. [Tanzer M.L., Science, **180**, 562 (1973).]

чается еще один тип структуры, создающей поперечную сшивку, а именно *лизинонорлейцин* (рис. 9.23), в образовании которого участвуют остатки лизина. Только в эластине обнаружен *десмозин*, образованный из боковых цепей четырех остатков лизина (рис. 9.24). *Значение поперечных связей в эластине состоит, по-видимому, в том, что они обеспечивают способность эластиновых волокон после растяжения восстанавливать исходную форму и размер.*

Участки эластина, расположенные между поперечными связями, богаты глицином, пролином и валином. Последовательности аминокислот в этих участках обладают в ряде случаев периодичностью (рис. 9.25).

Конформация обладающих периодичностью областей, а также связь между периодичностью и эластическими свойствами еще не исследованы. В то же время, учитывая роль эластина в артериальной динамике, представляется важным знать молекулярные основы функции данного белка. Это помогло бы понять сущность ряда сердечно-сосудистых заболеваний.

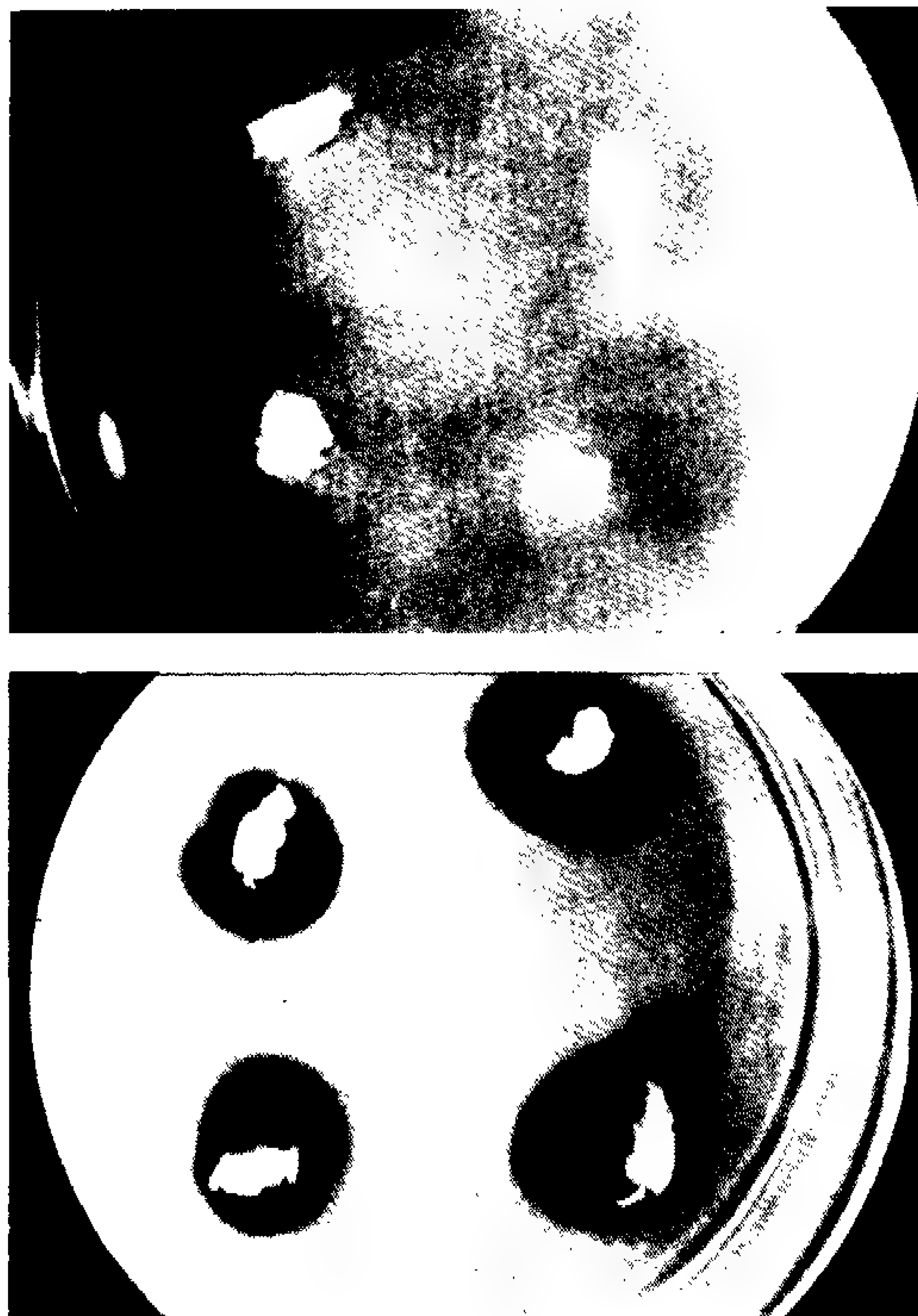


Рис. 9.22. Кусочки хвостового плавника головастика помещены на реконструированный коллагеновый гель (*наверху*). После 24 ч инкубации при 37°C вокруг каждого кусочка появляется прозрачная зона – результат активности коллагеназы (*внизу*). (Lapiere C. M., Gross J. In: Mechanisms of Hard Tissue Destruction, R. F. Sognnaes, ed., p. 681, Copyright 1963.)

9.16. Протеогликаны образуют основное вещество соединительной ткани

Соединительная ткань богата также *протеогликанами*, которые состоят из полисахаридных (около 95%) и белковых (около 5%) единиц. Эти полианионы, имеющие очень большие размеры, связывают воду и катионы, образуя основное вещество соединительной ткани. Протеогликаны определяют вязкоэластические свойства суставов и других анатомических структур, подвергающихся механической деформации. Полисахаридные цепи протеогликанов, называемые *гликозаминогликанами*, построены из *повторяющихся дисахаридных единиц*, содержащих производное *аминосахара – глюкозамина* или галактозамина. По крайней мере один из сахаров в дисахариде имеет *отрицательно заряженную* карбоксильную или сульфатную группу. Важнейшие гликозаминогликаны – это гиалуронат, хондроитинсульфат, кератансульфат, гепарансульфат и гепарин (рис. 9.26). Гепарансульфат подобен гепарину, за исключением того, что в нем меньше N- и O-сульфатных групп и больше N-ацетильных групп.



Рис. 9.21. При метаморфозе головастика из хвостового плавника быстро исчезает коллаген. (Lapiere C. M., Gross J. In: Mechanisms of Hard Tissue Destruction, R. F. Sognnaes, ed., p. 665, Copyright 1963.)

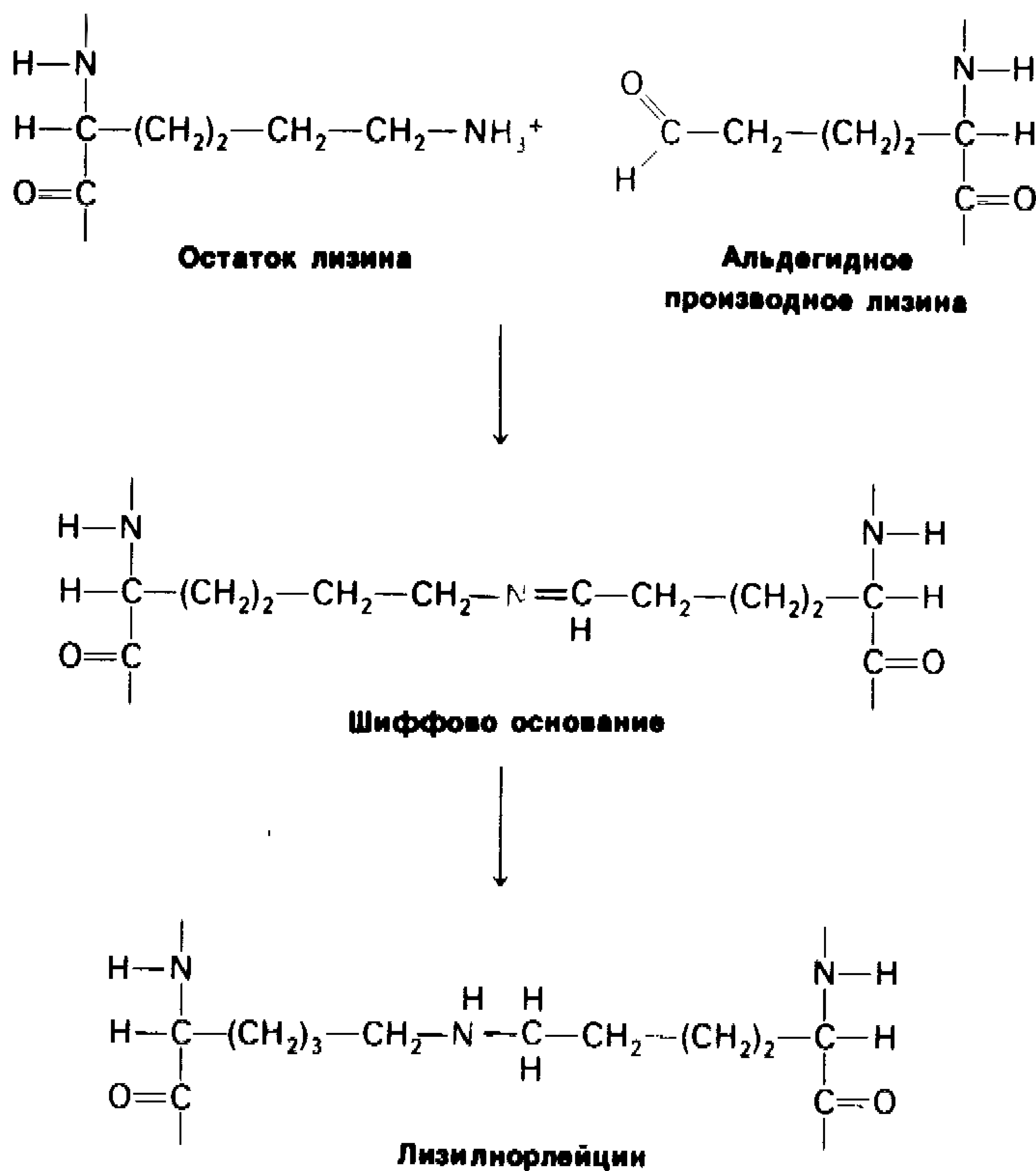


Рис. 9.23. Образование поперечной сшивки в виде лизилнорлейцина в коллагене и эластине.

В протеогликанах хряща (рис. 9.27) кератансульфат и хондроитинсульфат присоединены ковалентными связями к полипептидной цепи, называемой в данном случае *сердцевинным белком* (или core-белком). Примерно 140 образованных таким путем субъединиц в свою очередь присоединены с интервалом 300 Å нековалентными связями к длинной нити *гиалуроновой кислоты*. В формировании этого комплекса участвует небольшой *связывающий белок*. Масса полного комплекса составляет примерно 10^5 кДа и длину в несколько микрон. Протеогликаны других тканей могут иметь иную структуру. Это наводит на мысль, что рас-

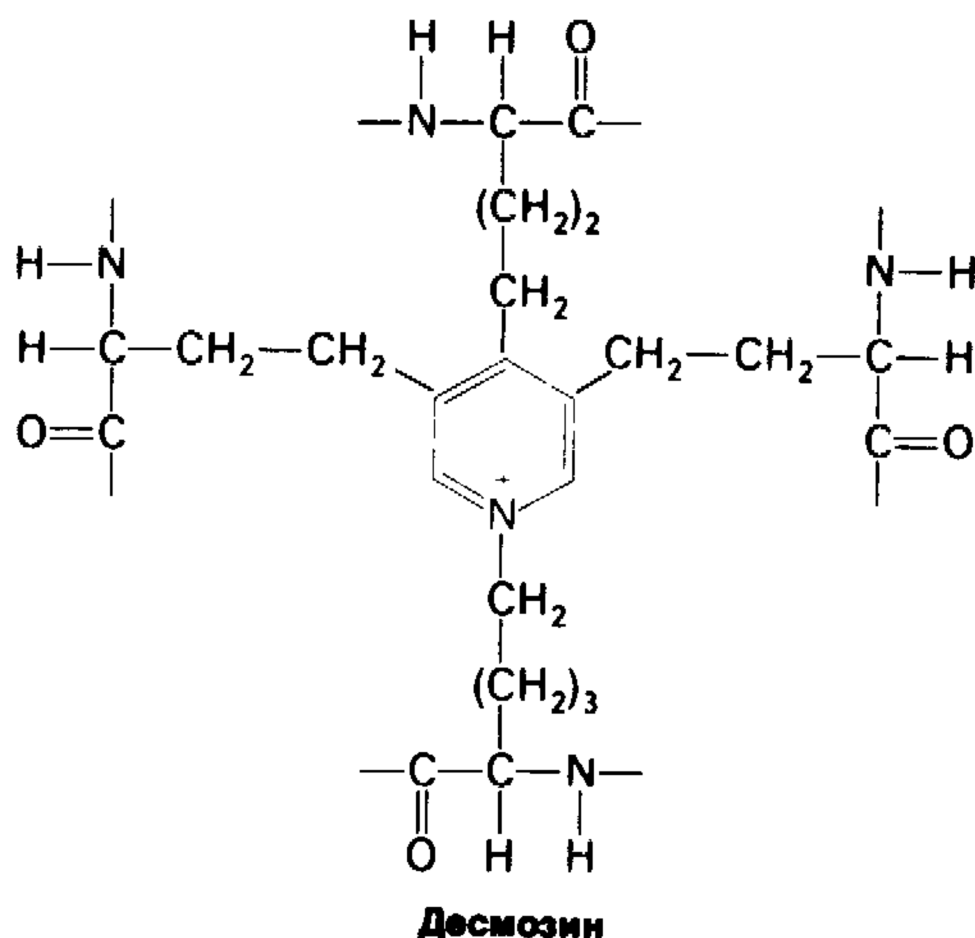


Рис. 9.24. Десмозин (поперечная сшивка в эластине) образуется из четырех боковых цепей остатков лизинов.

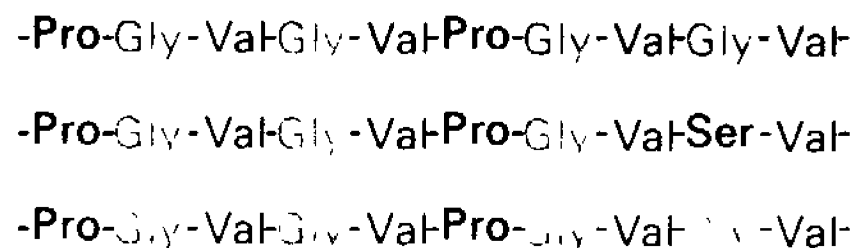
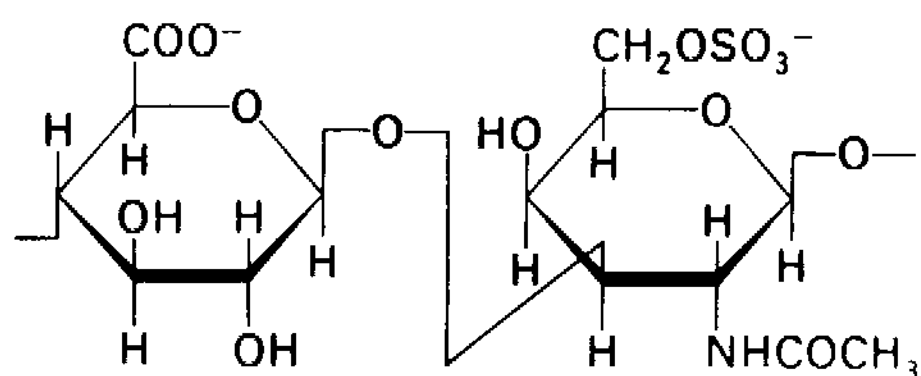
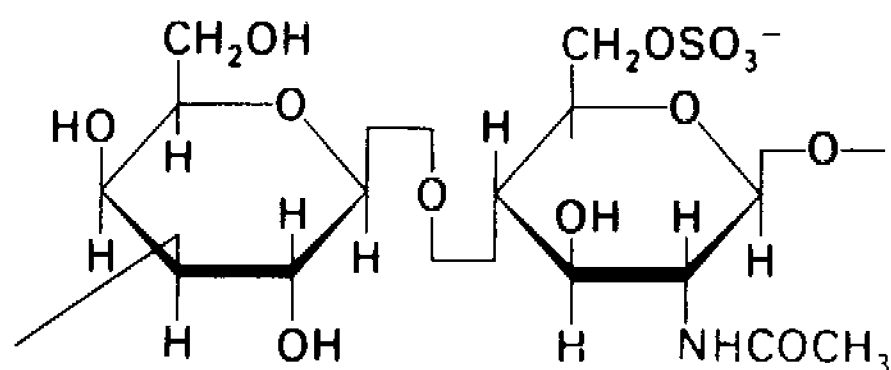
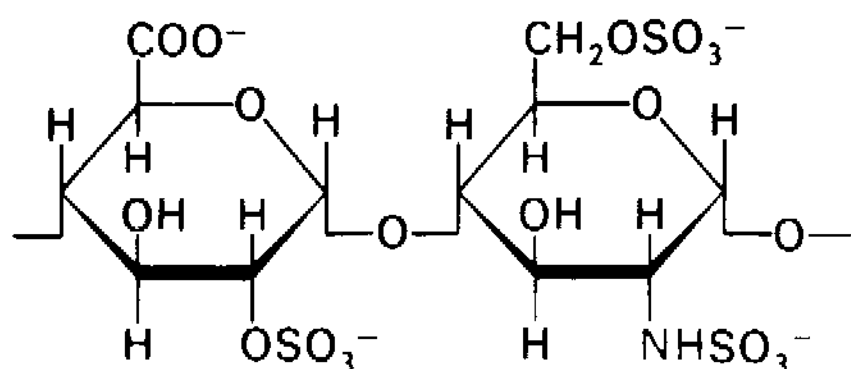
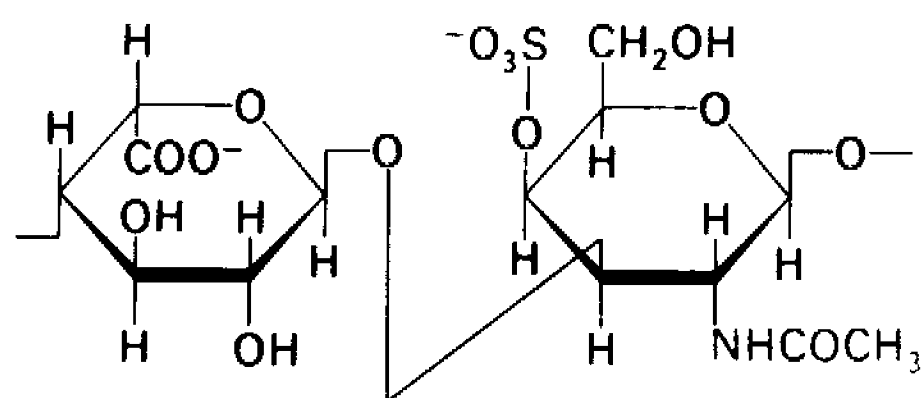


Рис. 9.25. Часть последовательности аминокислот растворимого предшественника эластина. Ясно виден повторяющийся характер последовательности.









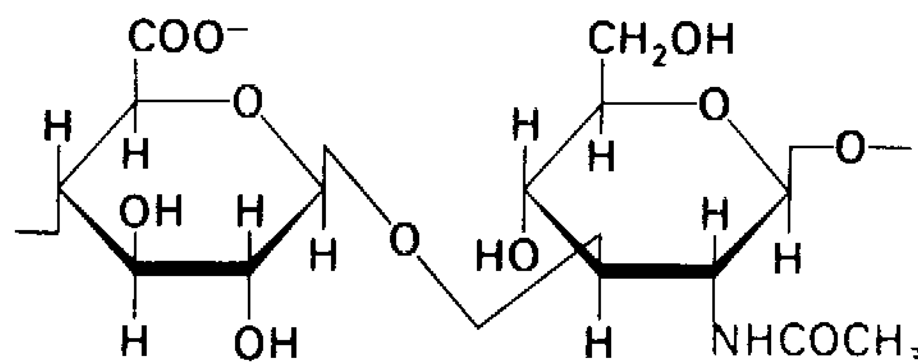


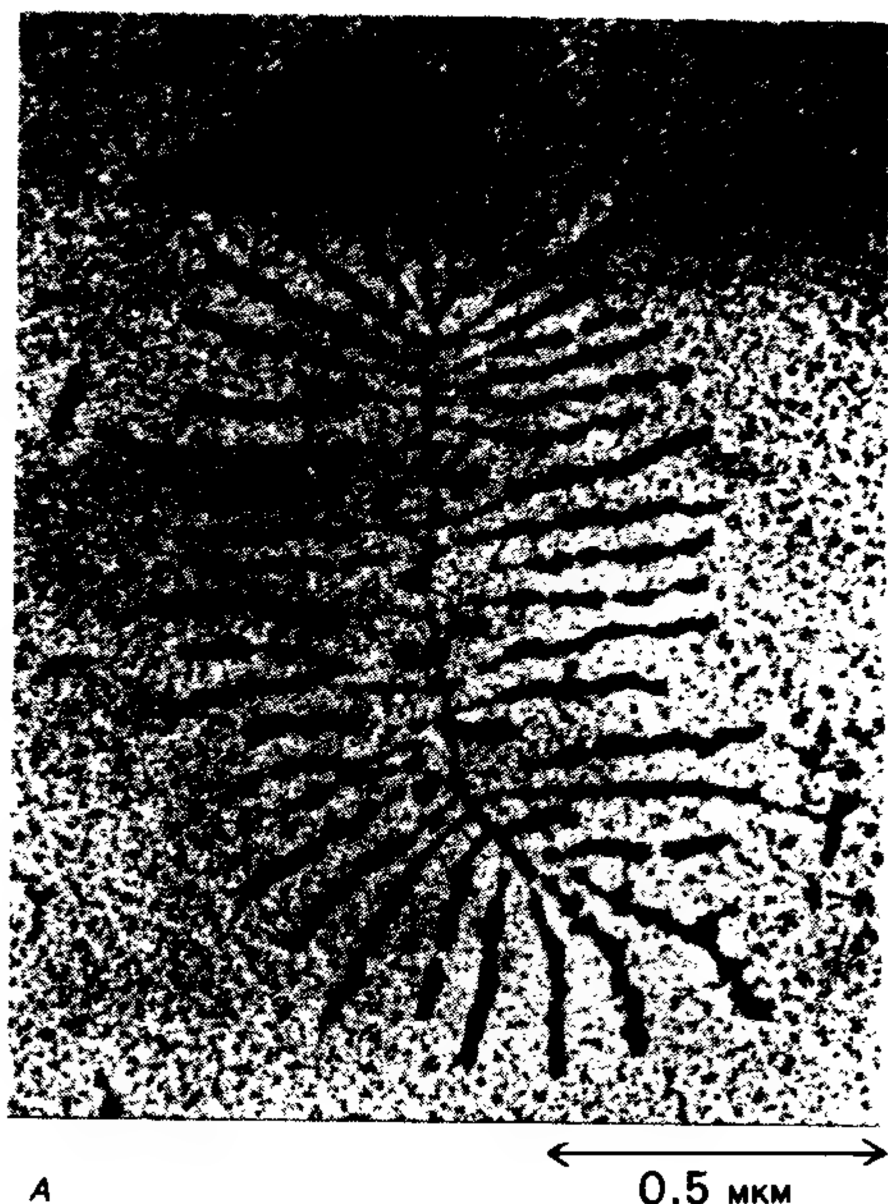
Рис. 9.26. Структурные формулы повторяющихся дисахаридных единиц в ряде основных гликозаминогликанов. Отрицательно заряженные группы показаны красным.

сматриваемый класс очень больших по размерам биомолекул выполняет несколько, пока еще неизвестных функций.

Заключение

Коллаген представляет собой группу родственных белков, обладающих очень высокой прочностью. Коллаген является основной волокнистой структурой кожи, костей, сухожилий, хряща, кровеносных сосудов и зубов. Известны четыре типа коллагена, различающиеся распределением в тканях. Основной структурной единицей коллагена является тропоколлаген, состоящий из трех цепей, каждая из которых включает 1000 аминокислотных остатков. Коллаген необычайно богат глицином и пролином. Кроме того, в коллагене содержатся гидроксипролин и гидроксилизин, редко встречающиеся в других белках. Последовательность аминокислот в коллагене характеризуется той особенностью, что почти каждый третий остаток в ней – глицин. Тропоколлаген представляет собой тройной спирально скрученный тяж длиной 3000 Å и диаметром 15 Å. Спираль каждой из цепей тропоколлагена по структуре не похожа на α-спираль. Между NH-группами глицина в одной цепи тропоколлагена и CO-группами в двух других цепях образуются водородные связи. Кроме того, стабильность коллагеновой спирали зависит от замыкающего эффекта остатков пролина и гидроксипролина, а также от водородных связей, образуемых гидроксильными группами гидроксипролина. Внутренняя часть тройной спирали занимает крайне ограниченное пространство, что обусловливает включение глицина как наименьшей по размеру аминокислоты в каждое третье положение в последовательность аминокислотных остатков в тропоколлагене.

В биосинтезе коллагена важную роль играет протеолитическая активация. Три цепи тропоколлагена типа I синтезируются в виде предшественников большего молекулярного веса – про-α1 (I) и про-α2. В этих проколлагеновых цепях некоторые остатки пролина превращаются в остатки гидроксипролина под действием пролилгидроксилазы. Активность этого фермента проявляется при наличии O_2, Fe^{2+} и α-оксоглу-



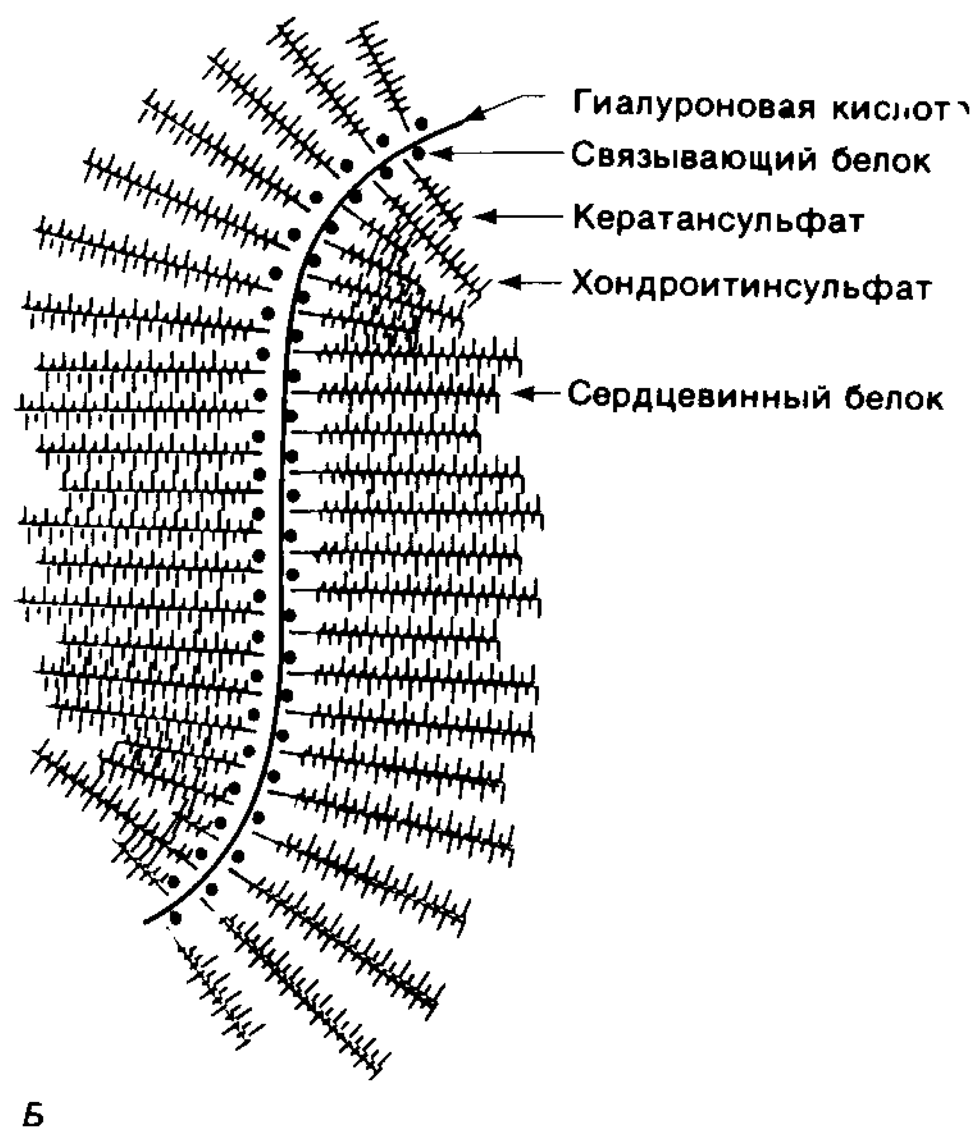


Рис. 9.27. *А* – электронная микрофотография протеогликанового агрегата из хряща эпифиза эмбриона коровы. Мономеры протеогликанов располагаются с регулярными интервалами по двум сторонам удлиненной центральной нити гиалуроната. (Печатается с любезного разрешения д-ра J. Buckwalter и д-ра L. Rosenberg.) *Б* – схематическое изображение. (Rosenberg L. In: Dynamics of Connective Tissue Macromolecules, M. Burleigh, R. Poole, eds., North-Holland, 1975, p. 105.) Заказ 665. стр. 33–38. Голдобина С.

тарата: в качестве восстанавливающего агента необходима также аскорбиновая кислота. Синтезированный в отсутствие аскорбиновой кислоты коллаген непрочен, так как он недостаточно гидроксилирован; такая ситуация характерна для цинги. Под действием другого фермента происходит гидроксилирование лизина. Далее к остаткам гидроксилизина цепей-предшественников присоединяются сахара. Процессы гидроксилирования и гликозилирования протекают в фибробластах, после этого проколлагены секретируются во внеклеточную среду. Здесь амино- и карбоксиконцевые области проколлагеновых цепей отщепляются проколлаген-пептидазами, образуя тропоколлаген, который спонтанно ассоциируется в фибриллы. Основой структуры коллагеновых волокон являются параллельные ряды молекул тропоколлагена, расположенные так, что один ряд сдвинут по отношению к другому на 1/4 длины молекулы. Последний этап созревания коллагенового волокна – формирование поперечных связей, придающих дополнительную прочность. Примером могут служить альдольные поперечные связи, возникающие при конденсации альдегидов, образованных путем окисления боковых цепей ряда остатков лизина.

Эластин – это нерастворимый, похожий на резину белок эластических волокон соединительной ткани. Он способен к обратимому растяжению в длину в несколько раз. Такие виды соединительной ткани, как связки и дуга аорты, особенно богаты эластином. Как и в коллагене, в эластине содержится много пролина и глицина; в отличие от коллагена в эластине нет гидроксилизина и мало гидроксипролина. Аминокислотный состав эластина характеризуется выраженным преобладанием неполярных аминокислот. Последовательность аминокислот в эластине имеет определенную периодичность. Так, часто повторяется последовательность Pro-Gly-Val-Gly-Val. Эластин синтезируется в виде растворимого предшественника, который далее переходит в нера-

створимую форму в результате образования различного рода поперечных сшивок. Одна из таких сшивок представляет собой десмозин-производное четырех остатков лизина. Как и в коллагене, формирование поперечных сшивок в эластине происходит с образованием альдегидов в качестве промежуточных соединений.

Второй основной макромолекулярный компонент соединительной ткани – протеогликаны, состоит из полисахаридного и белкового компонентов. Полисахаридные цепи, называемые гликозаминогликанами, построены из повторяющихся дисахаридных единиц, несущих большой отрицательный заряд. Протеогликаны составляют основное вещество соединительной ткани и определяют ее вязкоэластические свойства.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Eyre D.R., 1980. Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold, Science, **207**, 1315–1322.

Bornstein P., Traub W., 1979. The chemistry and biology of collagen. In: Neurath H. and Hill R.L. (eds.), The Proteins (3rd ed.), vol. 4, pp. 411–632, Academic Press.

Gross J., 1973. Collagen biology: structure, degradation, and disease, Harvey Lectures, **68**, 351–432.

Ross R., Bornstein P., 1971. Elastic fibers in the body, Sci. Amer., **224** (6), 44–52.

Монографии

Ramachandran G.N., Reddi A.H. (eds.), 1976. Biochemistry of Collagen, Plenum.

Burleigh P.M.C., Poole A.R. (eds.), 1975. Dynamics of Connective Tissue Macromolecules, American Elsevier.

Биосинтез коллагена

Prockop D.J., Kivirikko K.I., Tuderman L., Guzman N.A., 1979. The biosynthesis of collagen and its disorders. New Engl., J. Med., **301**, 13–23 and 77–85.

Fessler J.H., Fessler L.I., 1978. Biosynthesis of collagen, Ann. Rev. Biochem., **47**, 129–162.

Jackson D.S., 1978. Biosynthesis of collagen. In: Arnstein H.R.V. (ed.), Amino Acid and Protein Biosynthesis II, International Review of Biochemistry, vol. 18, pp. 233–259, University Park Press.

Fessler L.I., Morris N.P., Fessler J.H., 1975. Procollagen: biological scission of amino and carboxyl extension peptides, Proc. Nat. Acad. Sci., **72**, 4905–4909.

Bruns R.R., Hulmes D.J.S., Therrien S.F., Gross J., 1979. Procollagen segment-long-spacing crystallites: their role in collagen fibrillogenesis, Proc. Nat. Acad. Sci., **76**, 313–317.

Tanzer M.L., 1973. Cross-linking of collagen, Science, **180**, 561–566.

Гидроксилирование коллагена

Cardinale G.J., Udenfriend S., 1974. Prolyl hydroxylase, Advan. Enzymol., **41**, 245–300.

Hayaishi O. (ed.), 1974. Molecular Mechanisms of Oxygen Activation, Academic Press.

Berg R.A., Prockop D.J., 1973. The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen: evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen, Biochem. Biophys. Res. Comm., **52**, 115–120.

Коллагеназы

Gross J., Nagai Y., 1965. Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme, Proc. Nat. Acad. Sci., **54**, 1197–1204.

Seifter S., Harper E., 1971. The collagenases. In: Boyer P.D. (ed.), The Enzymes (3rd ed.), vol. 3, pp. 649–697, Academic Press.

Эластин

Sandberg L.B., 1976. Elastin structure in health and disease, Int. Rev. Connect. Tissue Res., **7**, 159–210.

Urry D.W., 1974. On the molecular basis for vascular calcification, Perspect. Biol. Med., **18**, 68–84. (Обсуждается связывание эластином ионов кальция.)

Гликозаминогликаны

Lindahl U., Höök M., 1978. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules, Ann. Rev. Biochem., **47**, 385–417.

Болезни соединительной ткани

Pinnell S.R., 1978. Disorders of collagen. In: Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Fredrickson D.S. (eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease (4th ed.), pp. 1366–1394, McGraw-Hill.

Trelstad R.L, Rubin D., Gross J., 1977. Osteogenesis imperfecta congenita: evidence for a generalized molecular disorder of collagen, Lab. Invest., **36**, 501–508.

Krane S.M., Pinnell S.R., Erbe R.W., 1972. Lysyl-protocollagen hydroxylase deficiency in fibroblasts from siblings with hydroxylysine-deficient collagen, Proc. Nat. Acad. Sci., **69**, 2899–2903.

Lapiere C.M., Lenaers A., Kohn L.D., 1971. Procollagen peptidase: an enzyme excising the coordination peptides of procollagen, Proc. Nat. Acad. Sci., **68**, 3054–3058. (Выявление молекулярного дефекта при дерматоспараксисе – наследственном заболевании соединительной ткани крупного рогатого скота.)

Major R.H. (ed.), 1945. Classic Descriptions of Disease (3rd ed.), Thomas. (Данное Картье описание цинги приводится на с. 587 этой книги.)

Nishikimi M., Udenfriend S., 1977. Scurvy as Scurvy inborn error of ascorbic acid biosynthesis, Trends Biochem. Sci., **2**, 111–112.

Вопросы и задачи

1. Химически синтезированный полипептид поли-L-пролин спирализуется так же, как и каждая из цепей в тройной спирали коллагена.

а) Поли-L-пролин не способен образовывать тройную спираль. Почему?

б) Poly (Gly-Pro-Pro) образует такую же тройную спираль, как и коллаген. Предскажите, какова будет термостабильность тройных спиралей: poly (Gly-Pro-Gly) по сравнению с poly (Gly-Pro-Pro).

в) Может ли poly (Gly-Pro-Gly-Pro) образовать такую же тройную спираль, как коллаген?

2. Дана аминокислотная последовательность -Gly-Leu-Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Ala-Pro-Gly-.

а) Какие из аминокислотных остатков могут гидроксилироваться пролилгидроксилазой по С-4?

б) Какая из пептидных связей должна быть наиболее чувствительна к действию коллагеназы Clostridium histolyticum?

3. В данной главе обсуждалось несколько типов ковалентных перекрестных связей в белках. Имеются ли ковалентные связи в следующих белках? Если да, то какие это связи:

а) рибонуклеаза; б) гемоглобин; в) фибрин; г) коллаген; д) эластин?

4. В отсутствие одного из субстратов – пептидилпролина – пролилгидроксилаза способна декарбоксилировать α-оксоглутарат. Для этой реакции требуются железо в восстановленной форме, O_2 и аскорбиновая кислота. На основе этого факта какой можно сделать вывод о ферментативном механизме реакции гидроксилирования?

ГЛАВА 10.
Введение в проблему биологических мембран

Обратимся теперь к биологическим мембранам, которые представляют собой высокоорганизованные структуры, построенные главным образом из белков и липидов. Мембраны играют жизненно важную роль. Они отделяют клетки от окружающей среды, тем самым обусловливая их индивидуальность. Однако *мембраны – это* отнюдь не глухая преграда, а *барьер с высокоизбирательной проницаемостью,* в котором имеются специфические молекулярные *насосы* и *каналы.* Эти транспортные системы регулируют молекулярный и ионный состав внутриклеточной среды. В клетках эукариот имеются еще и внутренние мембраны, отграничивающие органеллы, например митохондрии, хлоропласты, лизосомы. Функциональная специализация в процессе эволюции была тесно связана с формированием таких обособленных внутриклеточных участков, называемых обычно компартментами, или отсеками.

Мембраны регулируют также обмен информацией между клетками и средой. В частности, они несут *специфические рецепторы, воспринимающие внешние стимулы.* Движение бактерий к источнику пищи, ответ клетки-мишени на гормон (например, инсулин), восприятие света – все это примеры процессов, где в качестве первичного акта происходит распознавание сигнала специфическим рецептором на мембране. В свою очередь и *некоторые мембраны сами способны генерировать сигнал* – химический или электрический. Все это свидетельствует о том, что мембраны играют центральную роль в системе биологической коммуникации.

Два самых важных *процесса превращения энергии* в биологических системах протекают в мембранных системах, содержащих высокоупорядоченные наборы ферментов и других белков. Так, *фотосинтез,* т.е. процесс превращения света в энергию химической связи, происходит во внутренних мембранах хлоропластов (рис. 10.2), тогда как *окислительное фосфорилирование,* в ходе которого за счет окисления органических субстратов образуется аденозинтрифосфат

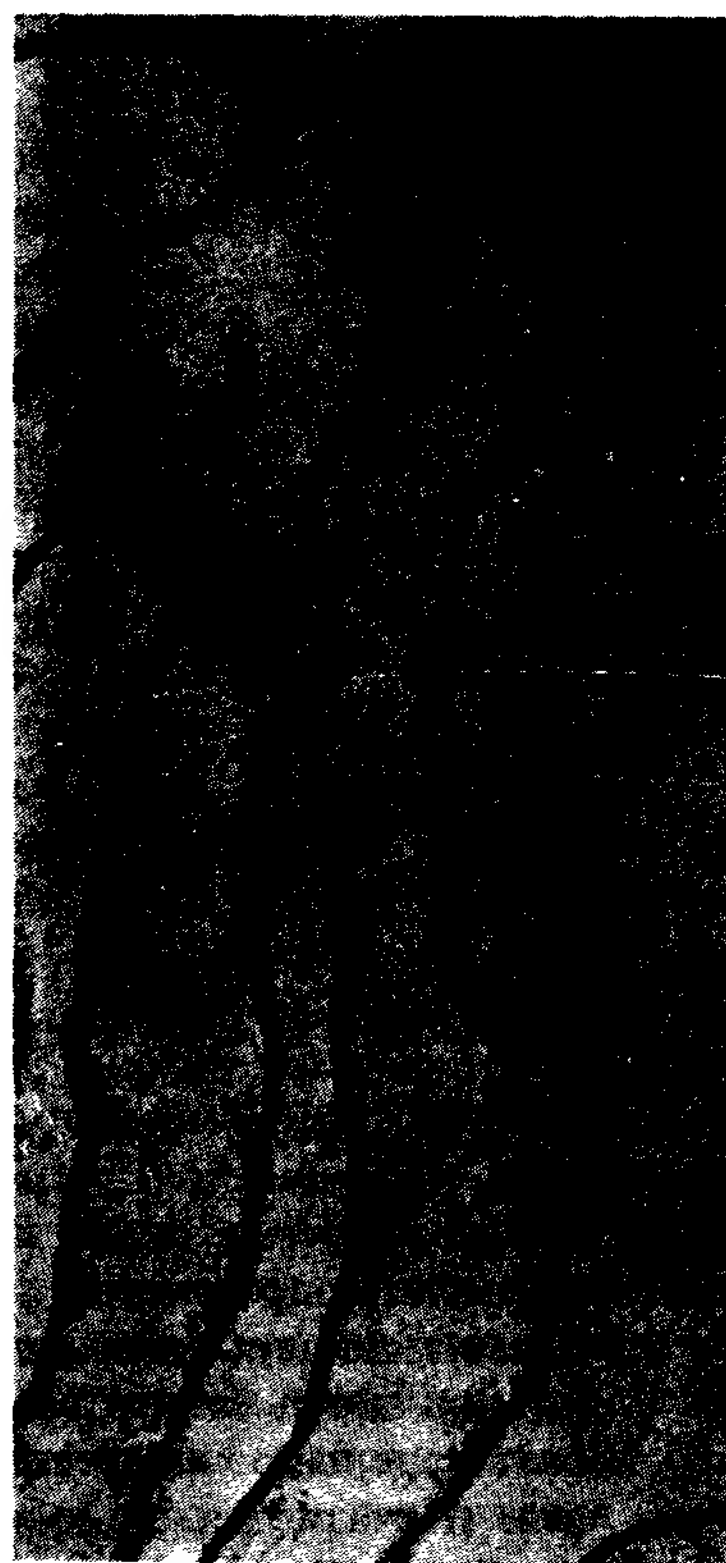


Рис. 10.1. Препарат плазматических мембран эритроцитов под электронным микроскопом. (Печатается с любезного разрешения д-ра V. Marchesi.)

(ATP), протекает во внутренних мембранах митохондрий. В последующих главах мы подробно рассмотрим эти, а также некоторые другие мембранные процессы. Настоящая глава посвящена некоторым наиболее важным свойствам, общим для большинства биологических мембран.

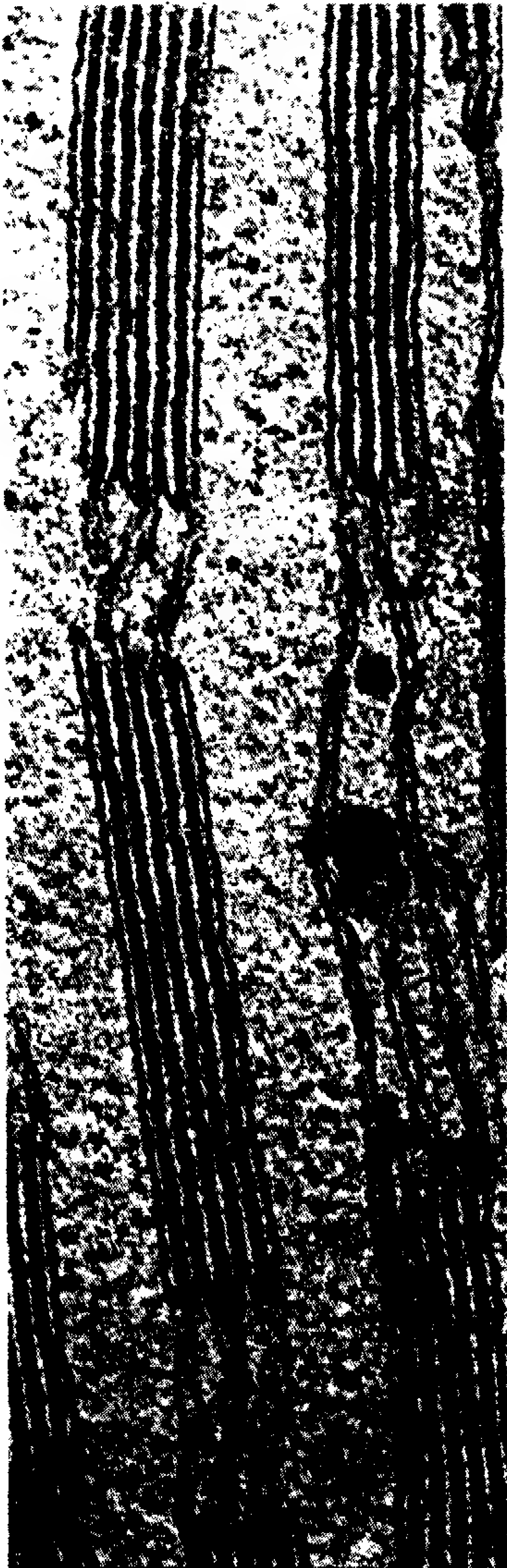


Рис. 10.2. Фотосинтезирующие комплексы тилакоидных мембран хлоропластов превращают свет в энергию химических связей. (Печатается с любезного разрешения д-ра M. Ledbetter. Ledbetter M.C., Porter K.R. Introduction to the Fine Structure of Plant Cells, Springer-Verlag, 1970.)

10.1. Общие свойства биологических мембран

Мембраны различаются как по функции, так и по структуре. Однако всем им присущи следующие основные свойства.

1. Мембраны представляют собой *плоскую структуру* толщиной в несколько молекул, образующую *сплошную перегородку* между отдельными отсеками (компартментами). Толщина мембран составляет обычно 60-100 Å.

2. Мембраны состоят главным образом из *липидов* и *белков*. Весовое соотношение белков и липидов для большинства биологических мембран лежит в пределах от 1 : 4 до 4 : 1. В мембранах имеются также *углеводные компоненты*, связанные с липидами и белками.

3. *Липиды мембран представлены относительно небольшими молекулами*, несущими гидрофильные и гидрофобные группы. В водной среде эти липиды спонтанно образуют *замкнутые бимолекулярные слои*. Такие *липидные двойные слои (бислои)* служат барьером для полярных соединений.

4. *Отдельные функции мембран опосредуются специфическими белками*. Белки выполняют роль насосов, каналов, рецепторов, ферментов и преобразователей энергии. Белки мембран встроены (интеркалированы) в липидный бислой, что создает пригодную для проявления их активности среду.

5. Мембраны - нековалентные надмолекулярные структуры; составляющие мембрану белки и липиды удерживаются вместе благодаря возникновению множества нековалентных взаимодействий, кооперативных по своему характеру.

6. Мембраны *асимметричны*: их наружная и внутренняя поверхности отличаются друг от друга.

7. Мембраны - *жидкие структуры*. Если молекулы липидов, так же как и белков, не зафиксированы в определенном месте силами специфического взаимодействия, то они легко диффундируют в плоскости мем-

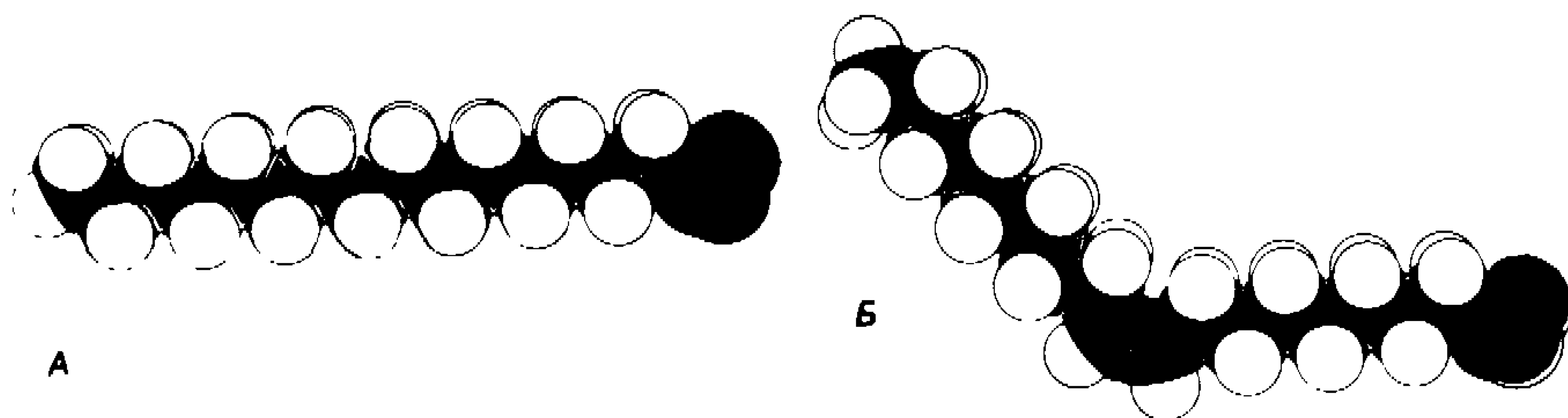


Рис. 10.3. Пространственные модели. *А* – пальмитат (C_{16}, насыщенный); *Б* олеат (C_{18}, ненасыщенный). Двойная связь *цис*-конфигурации обусловливает изгиб углеводородной цепи.

браны. Мембраны можно рассматривать как *двумерные растворы определенным образом ориентированных белков и липидов.*

10.2. Фосфолипиды – основной класс мембранных липидов

Липиды – это группа биомолекул, принципиально отличная от аминокислот и белков. По определению липиды нерастворимы в воде, но прекрасно растворяются в органических растворителях, например в хлороформе. Липиды выполняют различные биологические функции: они используются как топливо при окислении, как экономичная форма запасания энергии, а также как компоненты мембран. Первые две функции мы рассмотрим подробно в гл. 18. Здесь же речь идет о липидах в связи с мембранами. В состав мембран входят три основных типа липидов: *фосфолипиды, гликолипиды* и *холестерол.*



Компоненты фосфоацилглицерола

Начнем с фосфолипидов, поскольку это количественно превалирующий класс мембранных липидов. Фосфолипиды являются производным либо трехатомного спирта *глицерола,* либо более сложного спирта *сфингозина.* Фосфолипиды – производные глицерола называются *фосфоацилглицеролами.* Фосфоацилглицерол состоит из глицерола (основа структуры), двух цепей жирных кислот и фосфорилированного спирта.

Цепи жирных кислот в фосфолипидах и гликолипидах содержат обычно четное число углеродных атомов – как правило, от 14 до 24, но чаще всего 16 или 18. У животных жирные кислоты имеют неразветвленные углеводородные цепи. Жирные кислоты могут быть насыщенными и ненасыщенными. Двойные связи в ненасыщенных жирных кислотах почти всегда имеют *цис*-конфигурацию. Как будет показано далее, от длины и степени ненасыщенности жирнокислотных цепей в сильнейшей степени зависит текучесть мембран. На рис. 10.3 показана структура ионизированных форм двух широко распространенных жирных кислот – пальмитиновой (C_{16}, насыщенная жирная кислота) и олеиновой (C_{18}, одна двойная связь). Мы будем называть их в дальнейшем пальмитат и олеат, подчеркивая тот факт, что в физиологических условиях они нахо-

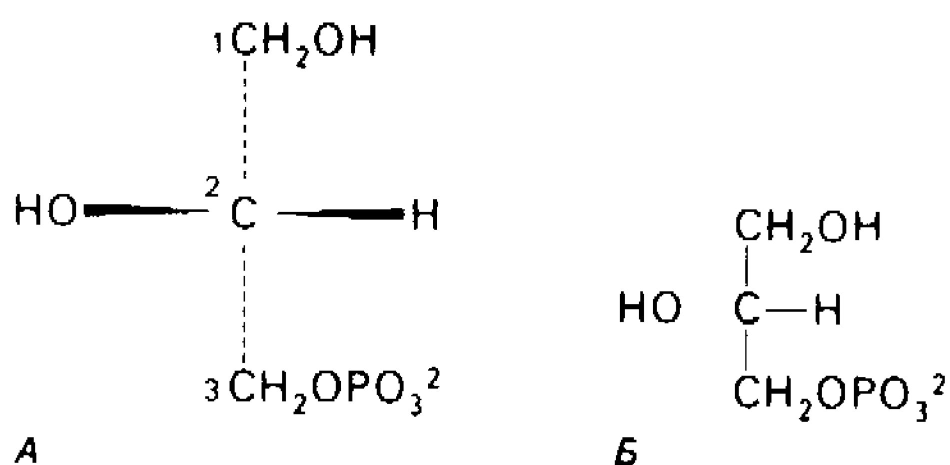


Рис. 10.4. Абсолютная конфигурация глицерол-3-фосфата в мембранных липидах. *А* – Н и ОН, присоединенные к С-2, находятся впереди плоскости рисунка, тогда как С-1 и С-3 – позади нее. *Б* – изображение той же структуры по Фишеру; в этом случае горизонтальные линии связей соответствуют связям, выступающим из плоскости рисунка вперед, а вертикальные линии – связям, расположенным позади плоскости рисунка.



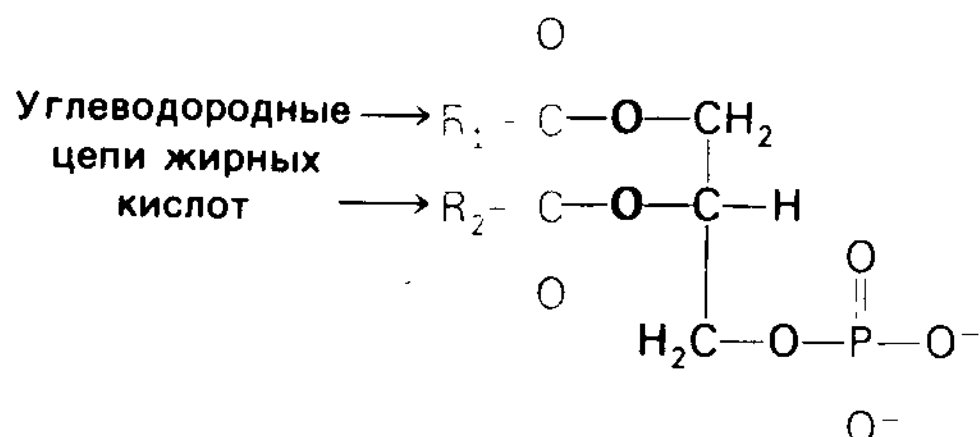
Пальмитат
(ионизированная форма пальмитиновой кислоты)



Олеат
(ионизированная форма олеиновой кислоты)

дятся в ионизированном состоянии. Номенклатура жирных кислот приводится в гл. 18.

В фосфоацилглицеролах гидроксильные группы при С-1 и С-2 в глицероле этерифицированы карбоксильными группами двух жирных кислот. Третий гидроксил глицерола этерифицирован фосфорной кислотой. Образующееся в результате соединение, называемое *фосфатидатом* (или диацилглицерол-3-фосфатом), представляет собой простейший фосфоацилглицерол. В мембранах фосфатидат содержится в минимальном количестве. Однако это соединение является ключевым промежуточным продуктом при биосинтезе других фосфоацилглицеролов.



Фосфатидат
(диацилглицерол-3-фосфат)



Серин



Этаноламин



Холин



Глицерол



Инозитол

Все основные фосфоацилглицеролы являются производными фосфатидата. Они образуются путем этерификации фосфатной группы фосфатидата с гидроксильной группой спиртов, таких, как серин, этаноламин, холин, глицерол и инозитол.

Соединив теперь между собой некоторые из этих компонентов, мы получим фосфатидилхолин – фосфоацилглицерол, присутствующий практически в любой мембране высших организмов.



Фосфатидилхолин
(1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолин)

$H_3C\ (CH_2)_{12}-CH=CH-CH(OH)-CH(NH-H)-CH_2-O-$ [redacted]

[redacted]

Остаток жирной кислоты

Остаток фосфорилхолина

Сфингомиелин

На рис. 10.5 приведены структурные формулы других важнейших фосфоацилглицеролов, а именно фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидилхолина, фосфатидилинозитола и дифосфатидилглицерола.

$$H_3C-(CH_2)_{12}-CH=CH-CH(OH)-CH(NH_3^+)-CH_2OH$$

Сфингозин

Единственный фосфолипид мембран, не являющийся производным глицерола,– это *сфингомиелин*.

Основу его структуры составляет *сфингозин* – аминоспирт с длинной ненасыщенной углеводородной цепью. В сфингомиелине сфингозин связан с жирной кислотой амидной связью. Кроме того, первичная гидроксильная группа в сфингозине этерифицирована с фосфорилхолином. Как мы увидим далее, сфингомиелин по конформации сходен с фосфатидилхолином.

10.3. В большинстве мембран имеются также гликолипиды и холестерол

Гликолипиды, как следует из названия,– это *липиды, содержащие сахар*. Гликолипиды животных клеток, подобно сфингомиелину, являются производными сфингозина. Аминогруппа сфингозина, как и в сфингомиелине, ацилирована жирной кислотой. Отличие гликолипидов от сфингомиелина заключается в природе компонента, присоединенного к первичному гидроксилу сфингозинового скелета. В гликолипидах в этом положении стоит один или несколько остатков сахара (а не фосфорилхолин). Простейший гликолипид – это *цереброзид*, содержащий только один остаток сахара (глюкозу

$$R-CO-O-CH_2-CH(O-CO-R')-CH_2-O-PO(O^-)-O-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$$

Фосфатидилсерин

$$R-CO-O-CH_2-CH(O-CO-R')-CH_2-O-PO(O^-)-O-CH_2-CH_2-NH_3^+$$

Фосфатидилэтаноламин

$$R-CO-O-CH_2-CH(O-CO-R')-CH_2-O-PO(O^-)-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$$

Фосфатидилхолин

Фосфатидилинозитол

$$R-CO-O-CH_2-CH(O-CO-R')-CH_2-O-PO(O^-)-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-O-PO(O^-)-O-CH_2-CH(O-CO-R')-CH_2-O-CO-R$$

Дифосфатидилглицерол

Рис. 10.5. Формулы некоторых фосфоацилглицеролов.

Остаток сахара

$H_3C-(CH_2)_{12}-CH=CH-CH(OH)-CH(NH)-CH_2-O-$

Остаток жирной кислоты

$O=C-R_1$

Цереброзид (гликолипид)

или галактозу). В более сложных гликолипидах, таких, как *ганглиозиды*, имеется разветвленная цепь из нескольких (вплоть до семи) остатков сахара.

К числу важных липидных компонентов многих мембран относится и *холестерол*. Он присутствует у эукариот, и его нет у большинства прокариот. Как правило, холестеролом богаты плазматические мембраны клеток эукариот, тогда как мембраны клеточных органелл содержат относительно мало этого нейтрального липида.

CH_3, $H-C-CH_2-CH_2-CH_2-C-CH_3$, CH_3, CH_3, CH_3, HO

Холестерол

10.4. Фосфолипиды и гликолипиды легко образуют бислои

Свойства мембранных липидов настолько разнообразны, что при знакомстве с ними можно прийти в смятение. Однако существует общий принцип их структурной организации: *мембранные липиды являются амфипатическими соединениями.* Их молекулы имеют как *гидрофильные*, так и *гидрофобные* группы (табл. 10.1).

Рассмотрим пространственную модель какого-либо фосфоацилглицерола, например фосфатидилхолина (рис. 10.6). По общей форме он напоминает прямоугольник. Две цепи жирных кислот расположены почти параллельно друг другу, а остаток фосфорилхолина направлен в противоположную от них сторону. Аналогичная конформация свойственна и сфингомиелину (рис. 10.7). В гликолипидах остаток сахара

Таблица 10.1. Гидрофобные и гидрофильные группы в липидах мембран

Липид мембраны	Гидрофобная группа	Гидрофильная группа
Фосфоглицериды	Цепи жирных кислот	Фосфорилированный спирт
Сфингомиелин	Цепь жирной кислоты и углеводородная цепь сфингозина	Фосфорилхолин
Гликолипид	То же	Один или несколько углеводных остатков
Холестерол	Вся молекула, кроме ОН-группы	ОН-группа при С-3

расположен практически так же, как остаток фосфорилхолина в сфингомиелине. Все это позволило прибегнуть к следующему способу изображения мембранных липидов: гидрофильную часть, называемую также *полярной головкой*, рисуют в виде кружочка, тогда как углеводородные хвосты – в виде прямых или волнистых линий (рис. 10.8).

Посмотрим теперь, как ведут себя фосфолипиды и гликолипиды в водной среде. Вполне очевидно, что их полярные головки обладают сродством к воде, тогда как углеводородные хвосты отталкивают воду. Следовательно, в водной среде фосфолипиды

Рис. 10.6. Пространственная модель молекулы фосфатидилхолина.

Рис. 10.7. Пространственная модель молекулы сфингомиелина.

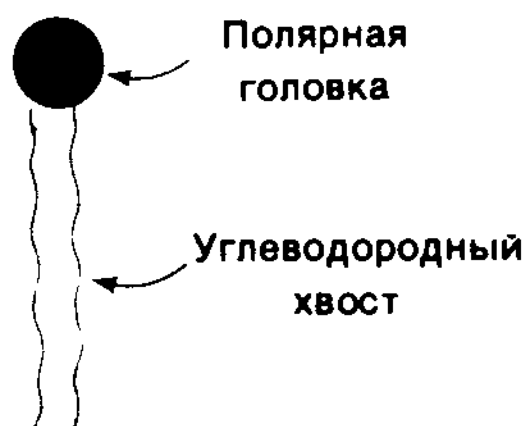


Рис. 10.8. Символическое изображение молекулы фосфолипида или гликолипида.

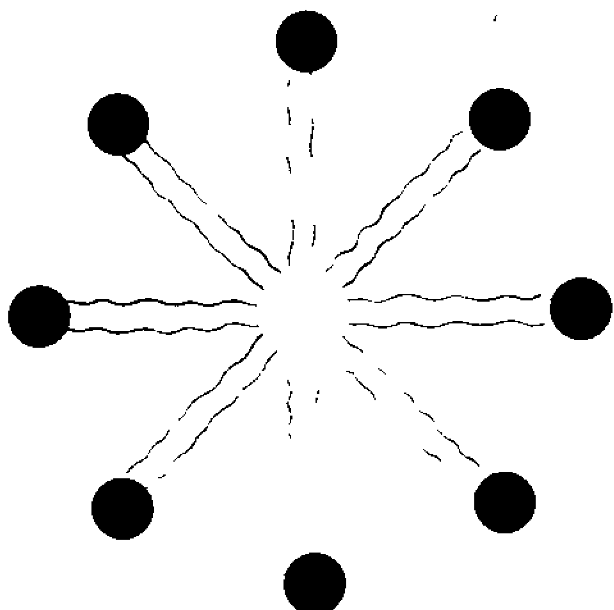


Рис. 10.9. Схематическое изображение отрезка мицеллы, образованной молекулами фосфолипида.

и гликолипиды могут образовать *мицеллы*, у которых полярные головки находятся на поверхности, а углеводородные хвосты спрятаны внутрь (рис. 10.9).

Возможен и другой способ организации, удовлетворяющий гидрофильным и гидрофобным требованиям мембранных липидов, а именно образование *бимолекулярного слоя*, или иначе *липидного бислоя* (рис. 10.10). *Оказалось, что в водной среде большинство фосфолипидов и гликолипидов образуют именно бимолекулярный слой, а не мицеллу.* Такое предпочтительное образование структуры бислоев имеет огромное значение в биологии. Дело в том, что размеры мицелл обычно невелики – менее 200 Å в диаметре. Бимолекулярные слои, напротив, достигают макроскопических размеров, вплоть до миллиметра (10^7 Å). Фосфо- и гликолипиды являются ключевыми компонентами мембран именно потому, что они легко образуют бимолекулярные слои. Кроме того, эти бислои, несмотря на жидкое состояние, могут выполнять функцию барьеров проницаемости.

Образование липидных бислоев осуществляется путем *самосборки*. Другими словами, способность к образованию бислоя заложена в структуре липидных молекул и определяется главным образом их амфипатическими свойствами. Формирование в воде липидных бислоев из гликолипидов или фосфолипидов идет быстро и спонтанно. *Основная сила, обеспечивающая самосборку бислоя,– это гидрофобные взаимодействия.* Вспомним, что гидрофобные взаимодействия играют также главную роль в складывании белковых молекул в водном растворе. По мере того как углеводородные хвосты мембранных липидов попадают во внутреннюю, неполярную часть бислоя, они теряют окружавшие их молекулы воды. Такое выделение воды приводит к большому увеличению энтропии. Кроме того, между углеводородными хвостами возникают *ван-дерваальсовы взаимодействия*, способствующие плотной упаковке углеводородных хвостов липидов внутри бислоя. И наконец, образованию бислоев способствует возникновение *электростатических сил* и *водородных связей* между полярными головками и молекулами воды. Итак, в стабилизации липидных бислоев участвуют все те силы, которые обеспечивают молекулярные взаимодействия в биологических системах.

10.5. Липидные бислои – нековалентные кооперативные структуры

Еще одно важное свойство липидного бислоя – это *кооперативность его структуры*. Цельность бислоя обеспечивается множе-

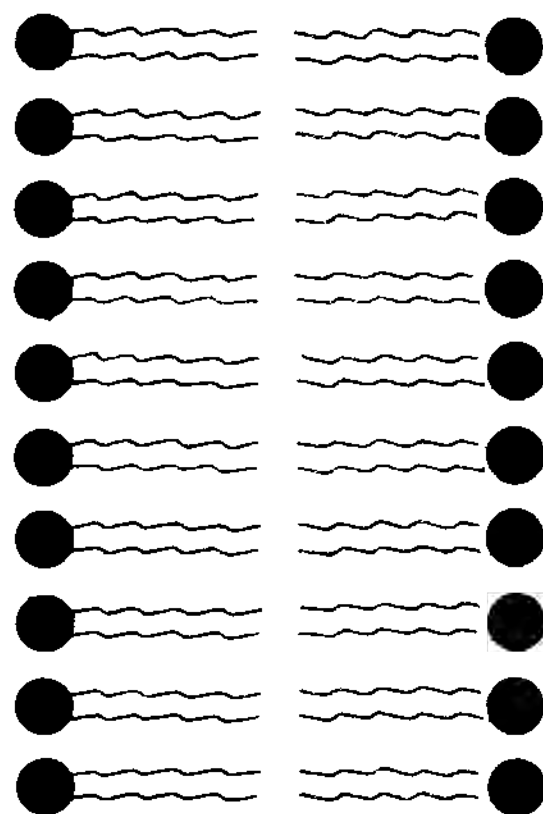


Рис. 10.10. Схематическое изображение отрезка двуслойной мембраны, образованной молекулами фосфолипидов.

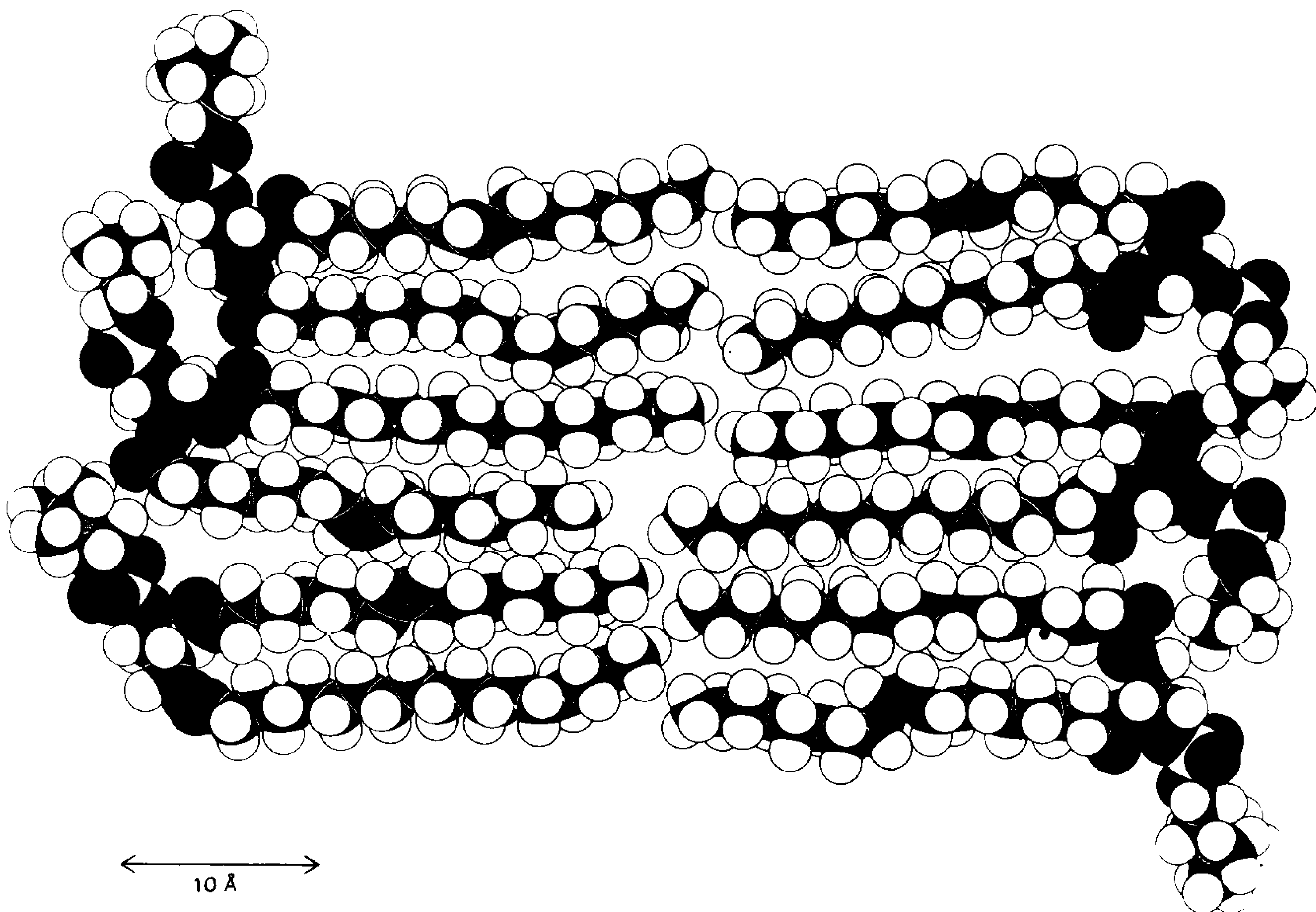


Рис. 10.11. Пространственная модель отрезка фосфолипидной двуслойной мембраны, обладающей высокой текучестью.

ством *усиливающих друг друга нековалентных взаимодействий*. Фосфолипиды и гликолипиды образуют в воде конгломераты (кластеры), в которых контакт углеводородных цепей с водой сведен до минимума. Эту ситуацию можно сравнить с овцами, сбившимися в тесную кучу в холодную погоду, чтобы снизить потерю тепла. Образованию кластеров способствуют также вандерваальсовы взаимодействия между соседними углеводородными цепями. Эти энергетические факторы приводят к трем биологически важным последствиям: 1) липидные бислои имеют тенденцию к *увеличению своей поверхности*; 2) липидные бислои стремятся *замкнуться* на себя так, чтобы на концах не оставалось доступных для контакта с водой углеводородных цепей; в результате замыкания возникает отграниченное пространство (компартмент); 3) липидные слои способны *самозапечатываться* (самосшиваться), поскольку любая дырка в бислое энергетически невыгодна.

10.6. Липидные бислои непроницаемы для ионов и многих полярных молекул

Измерение проницаемости липидных бислоев проводилось в двух четко охарактеризованных *искусственных системах: липидных пузырьках* и *плоских двуслойных мембранах*. С помощью этих модельных систем удалось определить основную функцию биологических мембран, а именно их роль непроницаемого барьера. Решающую роль имеет тот факт, что липидные бислои по своей природе оказались непроницаемы для ионов и большинства полярных соединений.

Липидные пузырьки (называемые также *липосомами*) представляют собой водную фазу, окруженную липидным бислоем (рис. 10.12). Для получения липосом приготовляют суспензию какого-либо подходящего липида, например фосфатидилхолина, в водной среде. Далее смесь *обрабатывают ультразвуком*; в результате образуются замкнутые липидные пузырьки одинакового размера. Липидные пузырьки можно также получить, быстро смешивая с водой раствор липидов в этаноле. Этого можно достичь

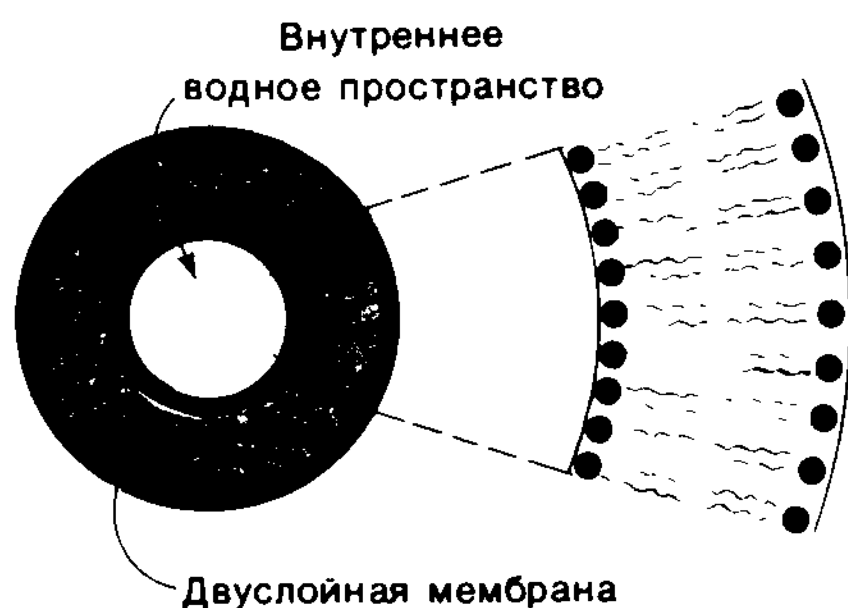


Рис. 10.12. Схематическое изображение липидного пузырька.

путем введения раствора липидов через тонкую иглу, что приводит к образованию пузырьков почти правильной сферической формы с диаметром около 500 Å. Для получения пузырьков большего размера (порядка 10^4 Å, или 1 мкм в диаметре) из суспензии фосфолипидов в смешанной системе растворителей медленно выпаривают органический растворитель.

Если получать липосомы в присутствии каких-то растворенных в воде ионов или молекул, то эти вещества окажутся в водной фазе липосом (рис. 10.13). Так, например, если липосомы диаметром 500 Å образуются в 0,1 М растворе глицина, то внутри каждой из них окажется примерно 2000 молекул глицина. Такие содержащие глицин липосомы можно отделить от окружающего раствора глицина путем диализа или гель-фильтрации. Если требуется определить проницаемость мембранного бислоя в отношении глицина, то для этого нужно измерить скорость выхода глицина из внутреннего компартмента липосом во внешнюю среду. Липосомы представляют интерес не только в плане изучения проницаемости. Оказалось, что они способны к слиянию с плазматической мембраной различных клеток, а это открывает возможность для введения в клетки самых разнообразных веществ, не способных проникать через мембрану. Избирательное слияние липосом с клетками определенных типов может быть успешно использовано для контролируемой доставки лекарственного вещества к клетке-мишени.

Второй тип искусственной мембраны — *плоская двуслойная мембрана* (или *мембранный бислой*). Получают эту структуру, используя отверстие размером 1 мм в перегородке между двумя водными растворами. Такая мембрана очень удобна для изучения электрических явлений в силу большого размера и простой формы. Способ получения больших двуслойных мембран разработали Поль Мюллер и Доналд Рудин (P. Mueller, D. Rudin). В раствор липида, из которого хотят получить мембрану, например в раствор фосфатидилхолина в декане, опускают тоненькую кисточку. Затем концом кисточки делают взмах через отверстие (диаметром 1 мм) в перегородке между двумя водными растворами. В результате отверстие перегораживается спонтанно образовавшейся тонкой липидной пленкой; избыток липидов скапливается по краям отверстия. Формирование плоской двуслойной мембраны из фосфатидилхолина занимает несколько минут. Нетрудно определить электропроводность такого макроскопического бислоя, поместив электроды в водную фазу по обе стороны мембраны (рис. 10.14). Можно определить, например, и ионную проницаемость мембраны, измеряя величину проходящего через нее тока в зависимости от приложенного напряжения.

Исследование проницаемости мембранных пузырьков и электропроводности плоских бислоев показало, что *липидная дву-*

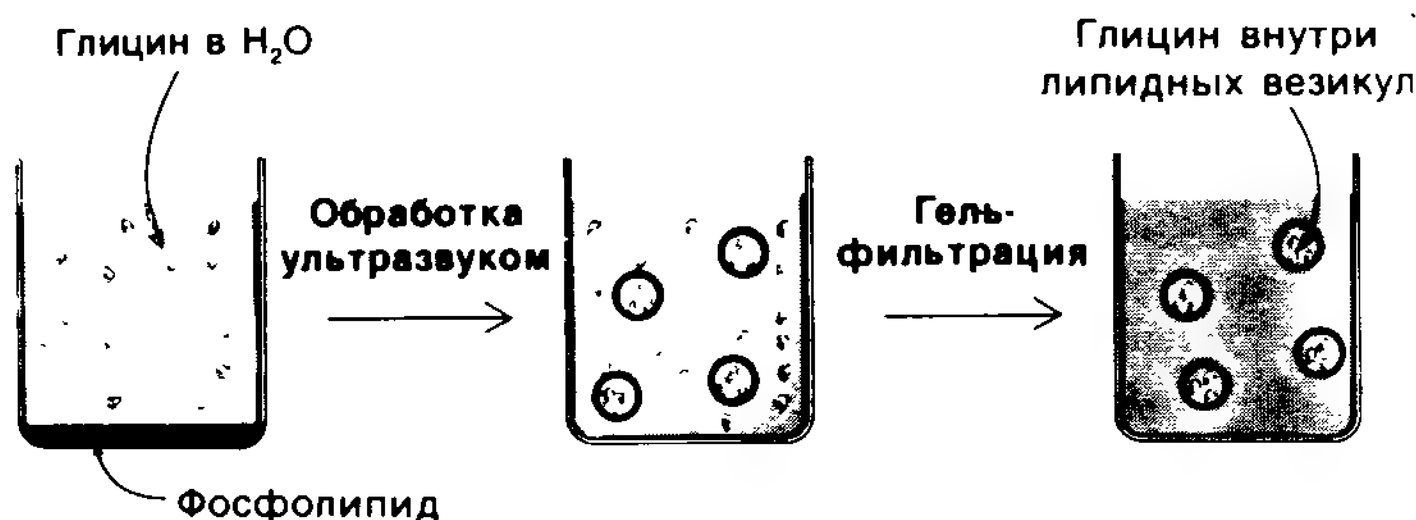


Рис. 10.13. Приготовление суспензии липидных пузырьков, содержащих молекулы глицина.

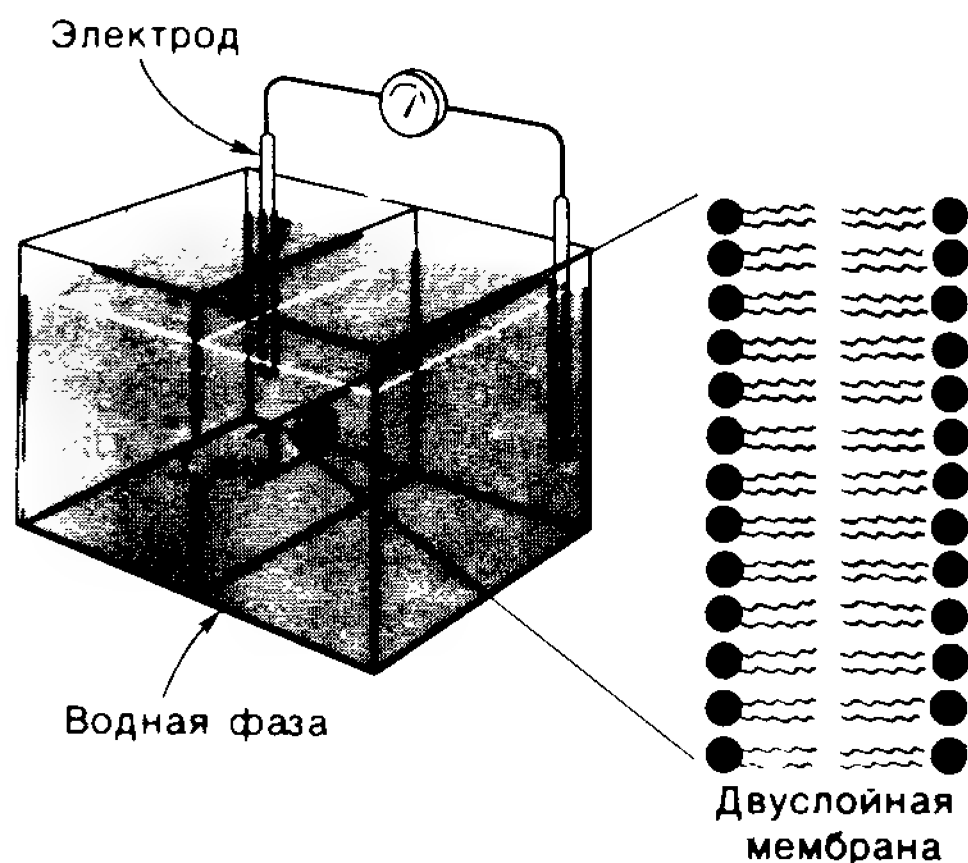


Рис. 10.14. Экспериментальная установка для изучения плоских двуслойных мембран. Двуслойная мембрана образуется таким образом, что затягивает собой отверстие диаметром 1 мм в перегородке, разделяющей две водные фазы.

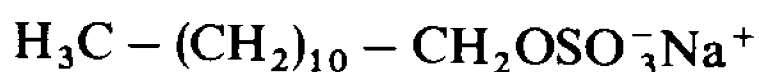
слойная мембрана обладает очень малой проницаемостью для ионов и большинства полярных молекул. Исключение из правила составляет вода, проникающая через такие мембраны. Экспериментально полученные коэффициенты проницаемости варьируют в широких пределах (рис. 10.15). Так, Na^+ и K^+ проходят через мембраны в 10^9 раз медленнее, чем вода. Триптофан, который при pH 7 является биполярным ионом, проходит через мембраны в 10^3 раз медленнее, чем индол, который сходен с триптофаном по структуре, но не несет ионизированных групп. *Коэффициенты проницаемости для низкомолекулярных соединений коррелируют с отношением их растворимости в неполярных растворителях к растворимости в воде.* Эта зависимость дает основание думать, что низкомолекулярные соединения проходят сквозь двуслойную мембрану следующим образом: сначала они теряют окружающую их гидратную оболочку, затем растворяются в углеводородном внутреннем слое мембраны, наконец диффундируют через этот внутренний слой к другой стороне мембраны, где вновь растворяются в воде.

10.7. Большинство мембранных процессов опосредовано белками

Обратимся теперь к мембранным белкам, ответственным за большинство динамических процессов, осуществляемых мембранами. Мембранные липиды создают барьеры проницаемости и тем самым отграничивают отдельные участки (компартменты), тогда как *специфические белки опосредуют отдельные функции мембран,* такие, как транспорт, передачу информации и преобразование энергии. При этом мембранные липиды создают среду, необходимую для действия этих белков.

Мембраны различаются между собой по содержанию белка. Так, в миелине, который служит изолирующей оболочкой многих нервных волокон, содержится мало белка (18%). Основной компонент миелина – липид с прекрасными изоляционными свойствами. С другой стороны, в большинстве клеток плазматические мембраны обладают значительно более высокой активностью и содержат различные насосы, каналы, рецепторы, ферменты. Количество белка в таких плазматических мембранах достигает, как правило, 50%. Наиболее высоким содержанием белка, вплоть до 75%, характеризуются мембраны, функционирующие как преобразователи энергии, в частности внутренние мембраны митохондрий и хлоропластов.

С помощью *электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН)* удается выявить основные мембранные белки.


$H_3C-(CH_2)_{10}-CH_2OSO_3^-Na^+$

Додецилсульфат натрия (ДСН)

При использовании этого метода мембраны сначала солюбилизируют 1%-ным раствором ДСН. Этот детергент разрушает большинство белок-белковых и белок-липидных связей. Далее полученный раствор наслаивают на полиакриламидный гель, также содержащий ДСН, и все это помещают на несколько часов в электрическое поле. В этой системе в отличие от других, не содержащих ДСН, электрофоретическая подвижность большинства белков зависит от их массы, а не от заряда. Дело в том, что отрицательный заряд молекул ДСН, присоединенных к белку, намного превышает общий заряд самого белка. Полосы разделившихся белковых фракций проявляют, обрабатывая гель краской типа кумасси си-

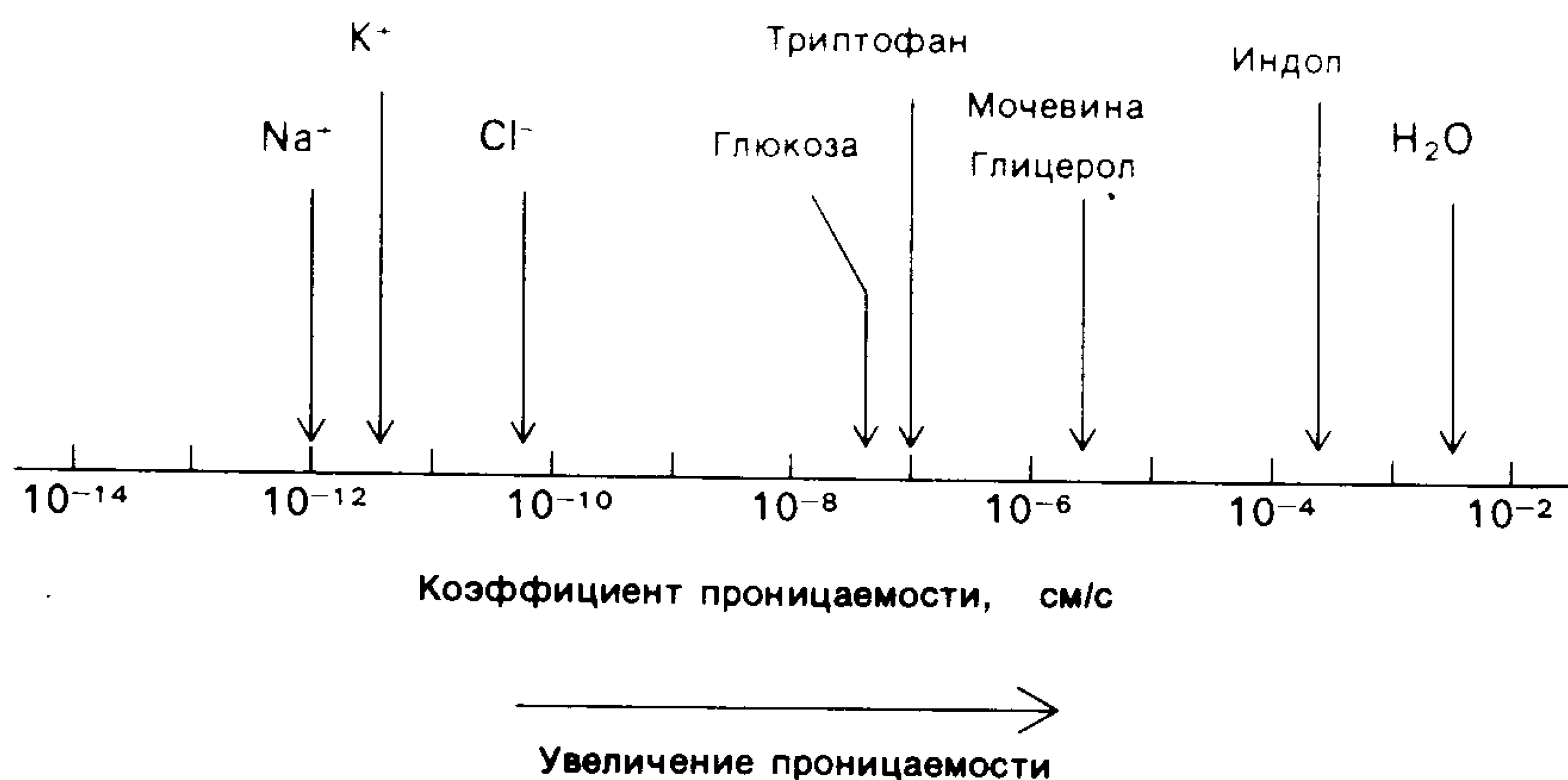


Рис. 10.15. Коэффициенты проницаемости липидных двуслойных мембран для некоторых ионов и молекул.

ний. При этом выявляются крайне малые количества белка – порядка нескольких микрограммов. На рис. 10.16 показаны результаты гель-электрофореза трех мембран – плазматической мембраны эритроцитов, фоторецепторной мембраны палочек сетчатки и мембраны саркоплазматического ретикулума мышцы. Отчетливо видно, что белковый состав этих трех мембран совершенно разный. Кроме того, мембраны различаются по набору входящих в их состав полипептидных цепей и по распределению массы. Таким образом, *мембраны, выполняющие неодинаковые функции, различаются также по белковому составу.*

10.8. Реконструкция функционирующих мембранных систем из очищенных компонентов

Большое множество мембранных белков было солюбилизировано и получено в очищенном виде (см. гл. 34–37). Некоторые из них сохраняют активность в растворе с детергентом. Например, фоторецепторный белок родопсин дает одну и ту же полосу поглощения 500 нм независимо от того, находится ли он в растворе детергента или же в составе мембраны сетчатки. Более того, в обоих случаях простетическая группа этого белка при освещении претерпевает одинаковые структурные изменения. Белок саркоплазматического ретикулума мышц калсеквестрин, связывающий кальций, сохраняет способность связывать кальций и вне мембраны. Из саркоплазматического ретикулума был выделен также кальциевый насос (фермент Ca^{2+}-АТРаза). Оказалось, что из смеси фосфолипида и белка кальциевого насоса могут образоваться функционально активные пузырьки, способные накапливать Ca^{2+} в присутствии АТР как источника энергии. *Реконструкция*

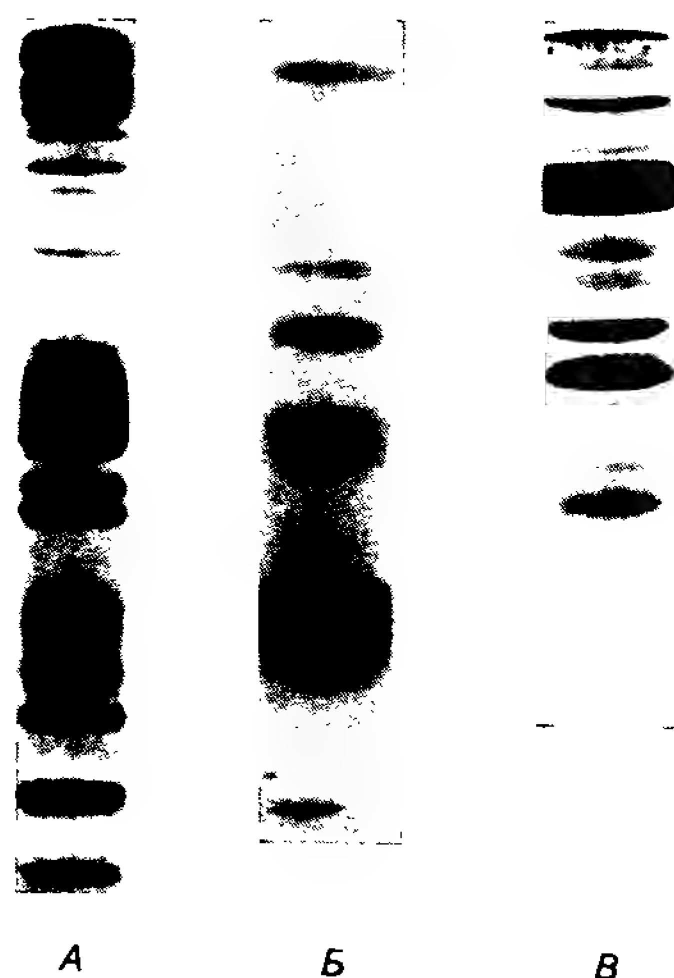


Рис. 10.16. Электрофореграммы различных мембран в ДСН-полиакриламидном геле. *А* – плазматическая мембрана эритроцитов. *Б* – мембранные диски палочек сетчатки. *В* – мембраны саркоплазматического ретикулума мышечных клеток. [Печатается с любезного разрешения д-ра T. Steck (рис. *А*) и д-ра D. MacLennan (рис. *В*).]

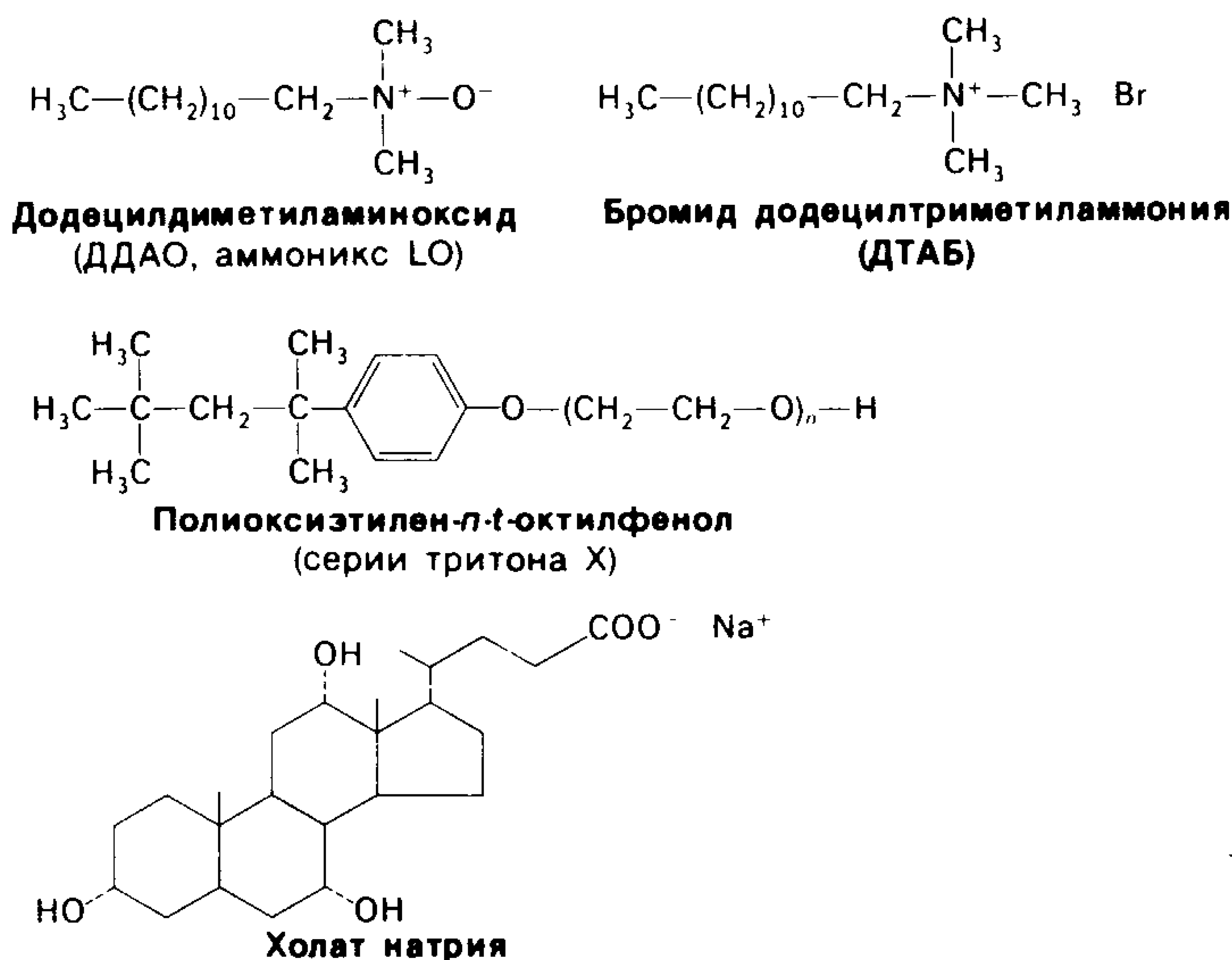


Рис. 10.17. Структуры детергентов, используемых для солюбилизации и очистки мембранных белков.

функционально активных мембранных систем из очищенных компонентов – надежный подход к изучению мембранных процессов.

10.9. Отдельные белки мембран глубоко погружены в липидный бислой

Некоторые мембранные белки удается выделить методами мягкой обработки, например экстрагированием раствором высокой ионной силы (например, 1 М NaCl). Другие белки оказываются более прочно связанными с мембраной – их можно отделить лишь с помощью детергента (рис. 10.17) или органического растворителя. Исходя из различий в прочности связи с мембраной, соответствующие белки подразделяют на *периферические* и *интегральные* (рис. 10.18). Интегральные белки образуют многочисленные связи с углеводородными цепями мембранных липидов, и потому их можно выделить только с помощью агентов, конкурентно участвующих в этих неполярных взаимодействиях. Периферические белки, напротив, связаны с мембранами электростатическими силами и водородными связями. Эти полярные взаимодействия могут быть разрушены при добавлении солей или изменении pH. Согласно последним данным, периферические белки мембран в большинстве случаев присоединяются к поверхности интегральных белков.

Для того чтобы определить, локализован ли данный белок во внутренней части мембраны, используют главным образом электронно-микроскопический метод замораживания—скалывания. Клетки или фрагменты мембраны быстро замораживают до температуры жидкого азота. Замороженную мембрану раскалывают далее толчком ножа микротома. Скол обычно проходит продольно посередине бислоя (рис. 10.19). В результате раскрывается значительная область *внутренней части* липидного бислоя. Далее эту

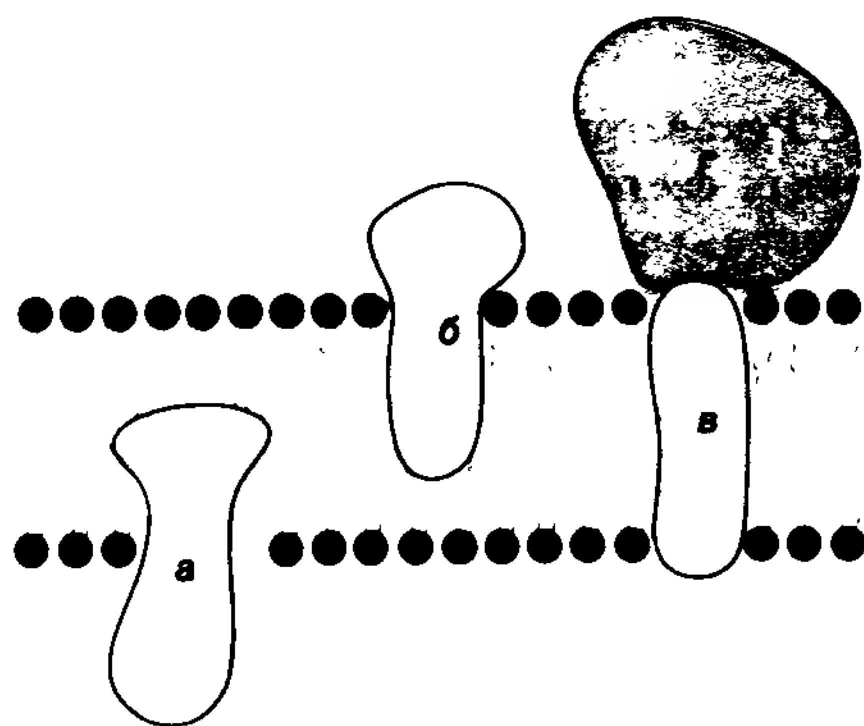


Рис. 10.18. Интегральные белки (*а, б, в*) мембраны образуют большое число связей с углеводородными цепями бислоя. Периферические мембранные белки (*г*) присоединяются к поверхности интегральных белков.

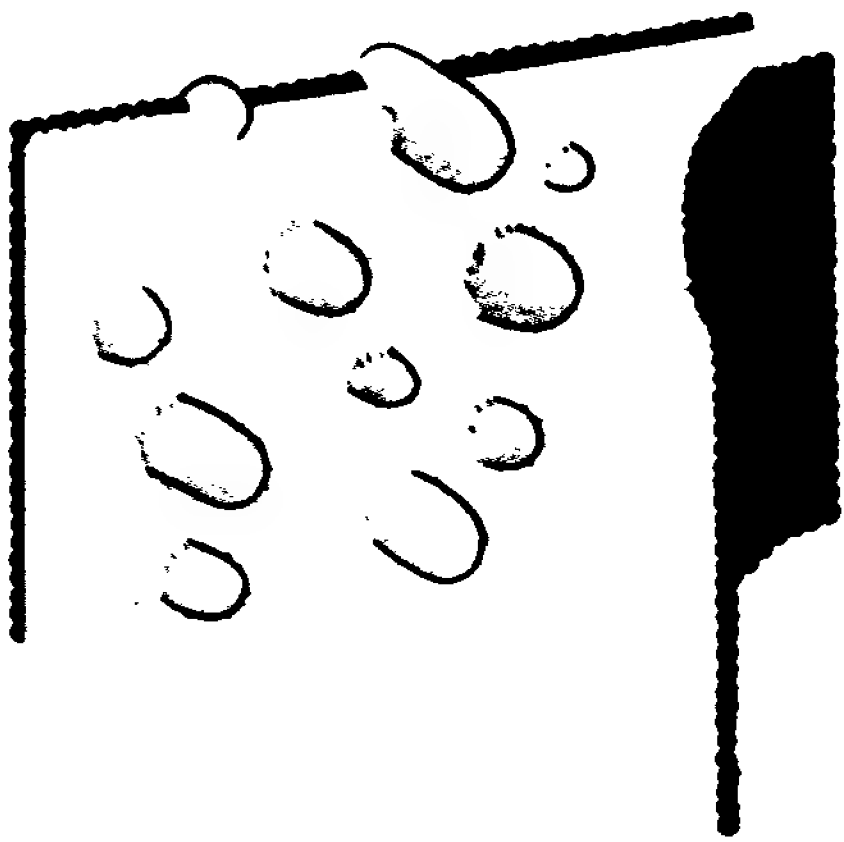


Рис. 10.19. Электронно-микроскопический метод замораживания – скалывания. Плоскость скола проходит посередине мембраны бислоя. [Singer S. J., Hosp. Pract., **8**, 81 (1973).]

обнажившуюся поверхность покрывают путем напыления слоем угля или платины, что дает реплику внутренней части бислоя. Для изучения наружной поверхности мембраны метод замораживания - скалывания используют в сочетании с методом глубокого травления. При этом сначала путем скола обнажают внутреннюю часть замороженной мембраны. Далее высушивают лед на прилежащей поверхности мембраны - это метод глубокого травления. Сочетание двух методов, называемое *электронной микроскопией с применением замораживания — травления*, позволяет получить картину внутренней части мембраны и обеих ее поверхностей. Достоинство рассматриваемого подхода состоит в том, что он не требует фиксации и обезвоживания биологического материала.

В исследованиях методом замораживания - травления было непосредственно доказано присутствие интегральных белков во многих биологических мембранах. Например, в мембране эритроцита содержатся глобулярные частицы высокой плотности диаметром около 75 Å (рис. 10.20). Большое число глобулярных частиц имеется также внутри мембраны саркоплазматического ретикулума. В отличие от этого искусственный бислой из фосфатидилхолина имеет совершенно гладкую поверхность скола. Оказались большей частью гладкими и поверхности скола миелиновой мембраны, что и следовало ожидать от этой относительно инертной мембраны, функционирующей главным образом в качестве изолирующей поверхности.

10.10. В мембране эритроцитов содержатся различные периферические и интегральные белки

В работах по изучению мембран эритроциты оказались наилучшим объектом исследований, поскольку они легко доступны и относительно просто устроены. Будучи лишены органелл, эритроциты имеют только одну мембрану - плазматическую. Путем осмотического лизиса можно получить *тени* эритроцитов, т. е. чистые плазматические мембраны, без цитоплазмы. На рис. 10.21 показаны результаты электрофоретического разделения белков такого мембранного препарата на полиакриламидном геле, содержащем ДСН. При окрашивании кумасси синим проявляется более десяти полос. Основные полосы пронумерованы и обозначаются как полосы 1, 2, 3, 4.1, 4.2, 5 и 6 (рис. 10.21). При окрашивании иодной кислотой - реактивом Шиффа (PAS-реакция)[1] выявляется несколько белковых фракций, богатых углеводами. Эти полосы обозначаются соответственно PAS-1, PAS-2, PAS-3 и PAS-4.

Где локализуются рассматриваемые белки в мембране эритроцита? Белки, соответствующие полосам 1, 2, 4.1, 4.2, 5 и 6, экстрагируются из мембран при повышении ионной силы раствора или изменений pH; следовательно, они расположены на периферии мембраны. Кроме того, на них не оказывает влияния инкубация интактных клеток или запаянных теней с различными протеолитическими ферментами. В то же время эти белки полностью расщепляются при обработке протеазами разорванных теней. *Отсюда можно заключить, что эти периферические белки находятся на цитоплазматической стороне мембраны эритроцитов.* Полоса 6 - это фермент гликолиза глицеральдегид-3-фосфат — дегидрогеназа (разд. 12.5), полоса 5 - актин, необходимый

[1] В отечественной литературе вместо сокращения ИКШ нередко употребляется более благозвучное ШИК, однако оно не соответствует сути, поскольку обработка иодной кислотой предшествует обработке реактивом Шиффа. Поэтому мы будем пользоваться распространенным сокращением латинскими буквами PAS (periodic acid - Schiff reagent).- *Прим. перев.*

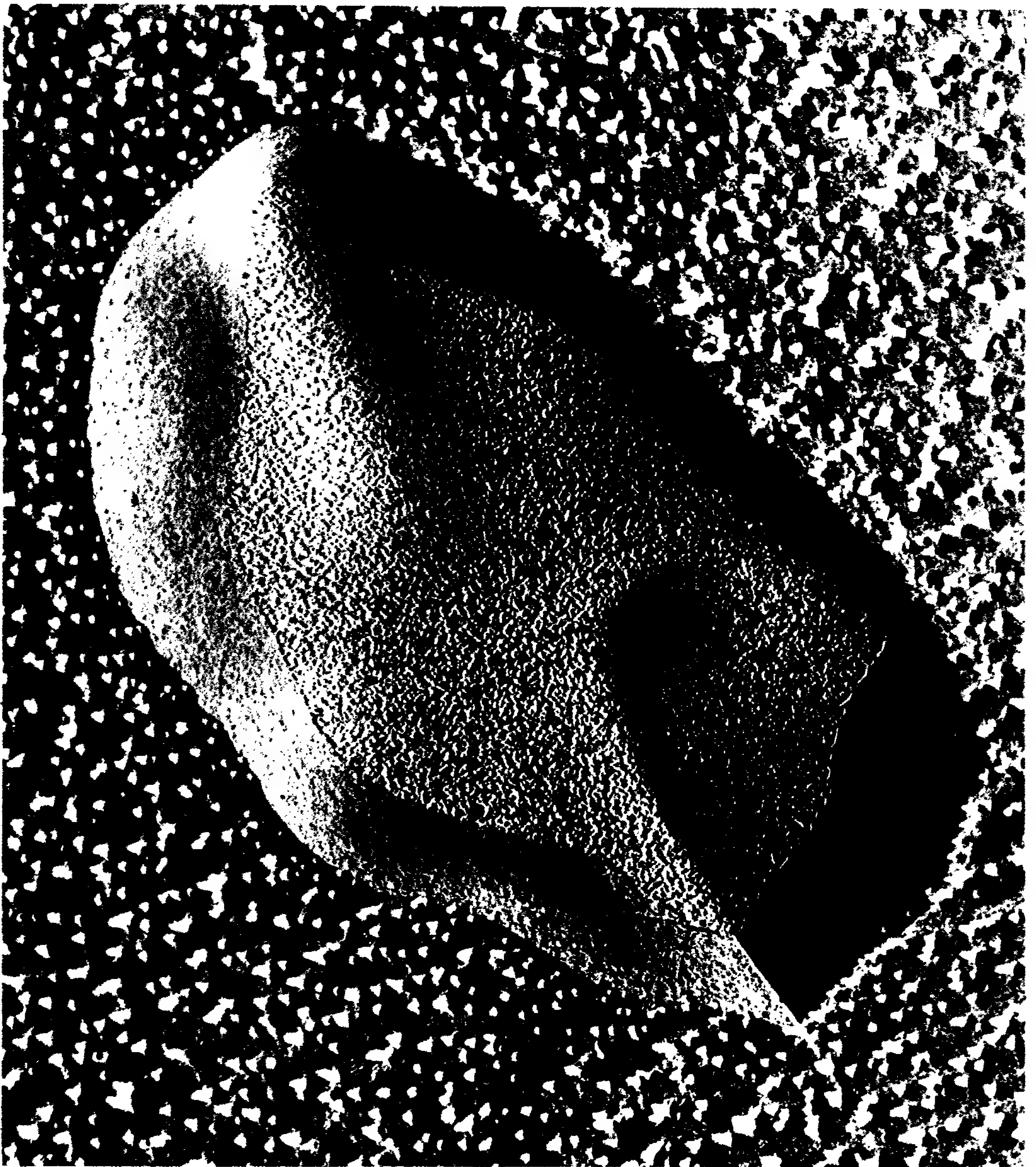


Рис. 10.20. Электронная микрофотография плазматической мембраны эритроцита, полученная с применением метода замораживания – травления. Внутренняя часть мембраны, обнажившаяся при сколе, богата глобулярными частицами диаметром около 75 Å. Эти частицы – интегральные белки мембраны. (Печатается с любезного разрешения д-ра V. Marchesi.)

для мышечного сокращения и обеспечивающий клеточную подвижность (разд. 34.1). Полосы 1 и 2 – *спектрин*, цепи которого, соединяясь, образуют разветвленную волокнистую сеть. Вместе с другими белками спектрин, по-видимому, *стабилизирует и регулирует форму мембраны эритроцитов*, изменяющуюся при прохождении клеток через мелкие кровеносные сосуды (рис. 10.22). Кроме того, эритроциты подвергаются сильному механическому сдавливанию при проталкивании крови сердцем.

Что касается полос 3 и 7 и всех четырех полос, окрашивающихся PAS-реактивом, то их можно отделить от мембраны эритроцита только с помощью детергентов или органических растворителей. Следовательно, эти полосы представлены интегральными белками мембраны. Такой вывод подтверждается результатами электронно-микроскопического исследования: методом замораживания – скалывания (рис 10.20) было показано, что часть белков эритроцита погружена в глубь углеводородной области мембраны.

10.11. Мембрану эритроцита пронизывают канал для анионов и сложный белок гликофорин

В мембране эритроцитов имеется *анионный канал*, делающий мембрану проницаемой для HCO_3^- и Cl^-. Быстрый обмен этих ионов через мембрану имеет большое значение для транспорта CO_2 эритроцитами. Как было показано относительно недавно, анионный канал – это димер *белка, представленного при электрофорезе полосой 3*; он составляет одну четверть общего количества белка в эритроцитарной мембране. Масса димера 95 кДа. Для определения локализации и ориентации белка полосы 3 использовали следующий прием: интактные эритроциты, разорванные тени и вывернутые наружу мембранные везикулы подвергали протеолитическому действию химотрипсина. Результат протеолиза зависел от того, что было доступно действию химотрипсина: наружная или внутренняя поверхность мембран или же обе поверхности сразу. Эти опыты показали, что *белок полосы 3 локализован на обеих сторонах эритроцитарной мембраны и все молекулы белка одинаково ориентированы* (рис. 10.23). Оказалось также, что углеводный компонент белка расположен на наружной поверхности. Трансмембранная локализация белка полосы 3 вполне соответствует его функции канала через мембрану.

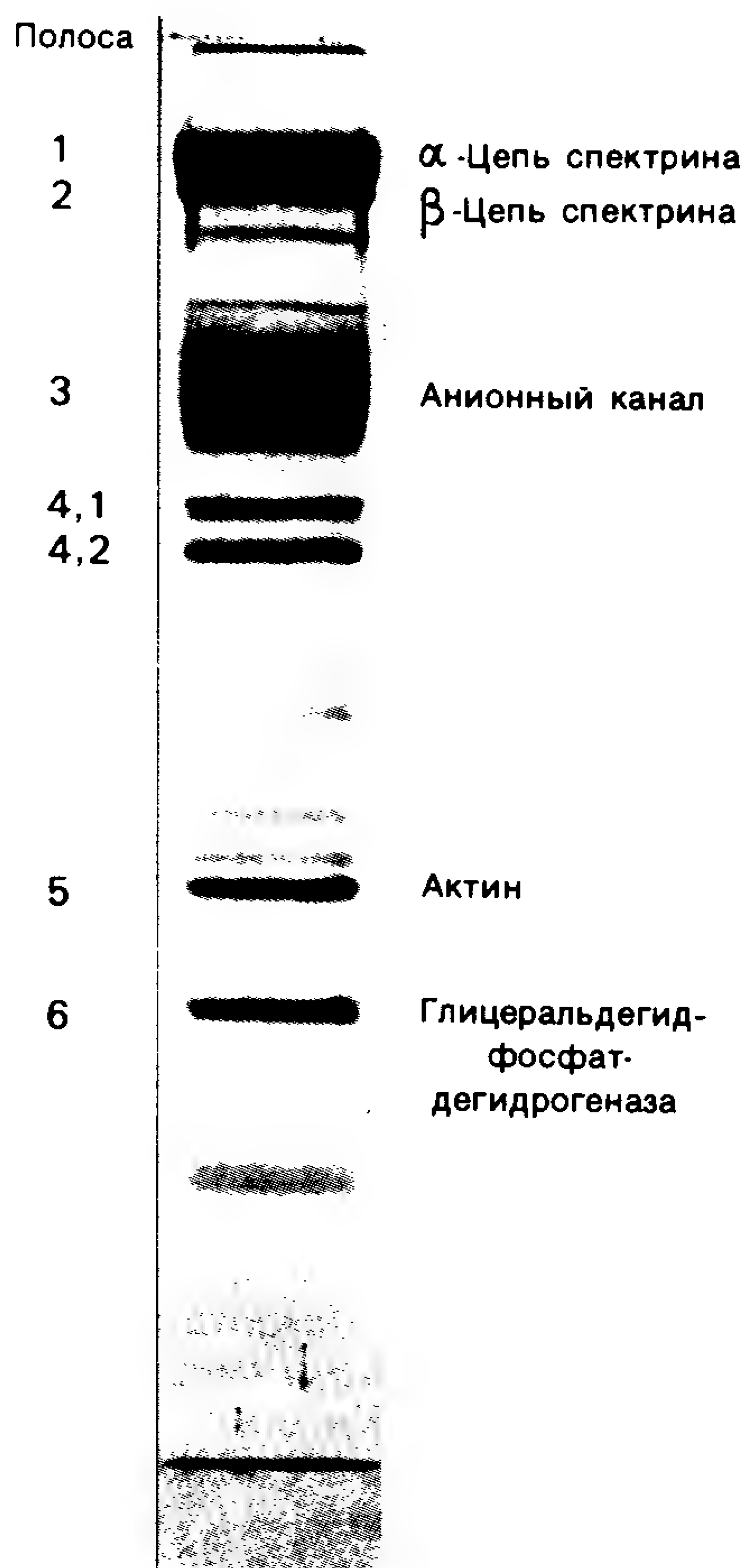


Рис. 10.21. Электрофоретическое разделение белков эритроцитарной мембраны на ДСН-полиакриламидном геле. Краситель кумасси синий. (Печатается с любезного разрешения д-ра V. Marchesi.)

Еще один хорошо изученный трансмембранный белок эритроцитов – это *гликофорин А*, состоящий из 16 олигосахаридных единиц, прикрепленных к единственной полипептидной цепи. На долю углеводов приходится 60% массы этого белка, так что его название (образованное от греческого «нести сахар») вполне заслуженно. Из-за высокого содержания углеводов гликофорин интенсивно окрашивается PAS-реактивом.



Рис. 10.22. При прохождении через мелкие кровеносные сосуды (капилляры) эритроциты подвергаются обратимой деформации. (Braehemark P. I. Intravascular Anatomy of Blood Cells in Man, Basel, S. Karger AG, 1971.)

Этот белок составляет *полосу PAS-1*. Исследования с применением протеолиза, химической модификации, а также электронной микроскопии показали, что гликофорин А состоит из трех доменов : 1) N-концевой области, содержащей все углеводные единицы и локализованной на наружной стороне мембраны; 2) гидрофобного срединного участка, погруженного в углеводный слой мембраны, и 3) С-концевой области, содержащей много полярных и ионизированных боковых цепей и расположенной на внутренней стороне эритроцитарной мембраны (рис. 10.24). Несмотря на большое количество данных о структуре гликофорина, функция его остается неизвестной.

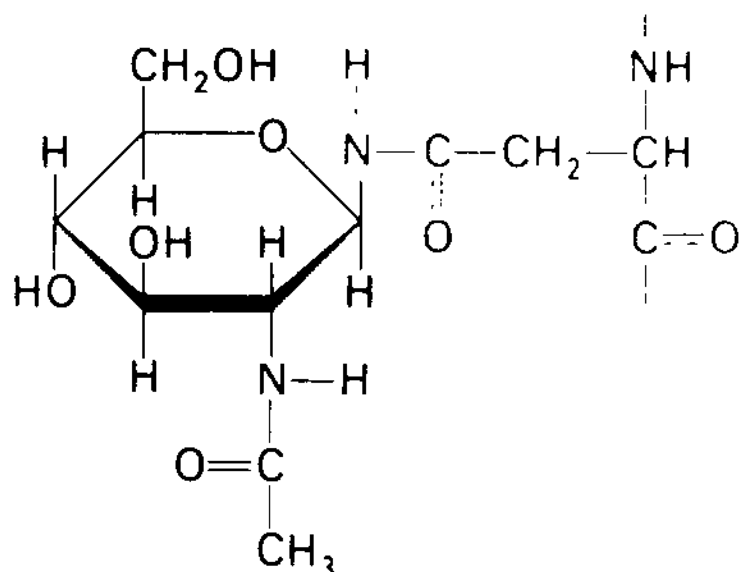
10.12. Углеводные единицы расположены на наружной стороне плазматической мембраны

В клеточных мембранах эукариот содержится от 2 до 10% углеводов в форме *гликолипидов* и *гликопротеинов*. Как было сказано выше (разд. 10.3), гликолипиды высших организмов представлены производными сфингозина с одним или более остатками сахара. В мембранных гликопротеинах одна или несколько углеводных цепей присоединены к боковым цепям серина, треонина или аспарагина (обычно через N-ацетилглюкозамин или N-ацетилгалактозамин). Локализацию этих углеводных групп в мембране определяют путем использования специфической метки. Подходящей меткой оказались *лектины* – растительные белки, обладающие высоким сродством к специфическим углеводным остаткам. Например, *конканавалин А* присоединяется к внутренним и нередуцирующим концевым остаткам *α-маннозы*, тогда как *агглютинин из зародыша пшеницы* присоединяется к концевым остаткам N-ацетилглюкозамина. Эти лектины хорошо видны в электронном микроскопе, когда они соединены с ферритином – белком, содержащим гидроксид железа и потому обладающим высокой электронной плотностью. Оказалось, что конъюгат конканавалина А с ферритином специфически связывается на наружной, но не на внутренней поверхности мембраны эритроцитов. Такая же асимметрия наблюдалась и в отношении связывания многих других лектинов мембранами различных клеток. Таким образом, наружная локализация углеводных единиц анионного канала и гликофорина (рис. 10.23 и 10.24) отражает общий принцип строения мембран, а именно: *остатки сахаров локализованы на наружной поверхности плазматической мембраны. Во всех исследованных к настоящему времени клетках млекопитающих остатки сахаров*

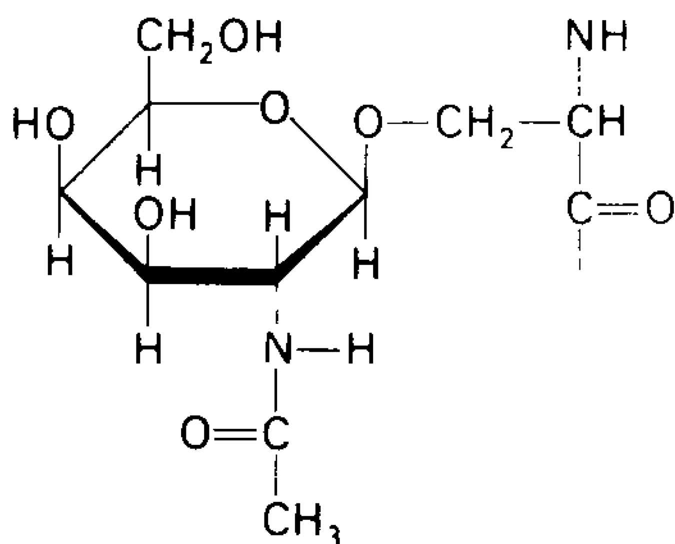
в плазматических мембранах локализованы только на наружной стороне мембраны (рис. 10.25).

Возможно что углеводные группы служат для ориентирования гликопротеинов в мембране. Обладая ярко выраженными гидрофильными свойствми, остатки сахаров в гликопротеинах или гликолипидах должны располагаться на поверхности мембраны, а не в ее углеводородной сердцевине. Энергетическая цена встраивания олигосахаридной цепи в углеводородное окружение внутри мембраны очень высока. Стало быть, существует барьер, препятствующий свободному вращению гликопротеина от одной стороны мембраны к другой. Углеводные компоненты мембранных гликопротеинов способствуют поддержанию асимметрии биологических мембран.

Углеводы на поверхности клетки могут играть также важную роль в *межклеточном узнавании*. От узнавания клетками друг друга зависят такие, например, процессы, как формирование тканей путем взаимодействия различных клеток или распознавание чужеродных клеток иммунной системой высших организмов. Углеводы обладают потенциальной возможностью к созданию огромного структурного разнообразия. Так, набор углеводов на поверхности клеток имеет колоссальное число вариантов потому, что: 1) моносахариды могут соединяться друг с другом через любой из своих гидроксилов; 2) связь по С-1 может быть как α-, так и β-конфигурации и 3) возможно интенсивное ветвление цепи. В самом деле, из четырех сахаров может образоваться гораздо больше разных олигосахаров, чем из четырех аминокислот – разных олигопептидов.



N-ацетилглюкозамин, присоединенный к остатку аспарагина



N-ацетилгалактозамин, присоединенный к остатку серина

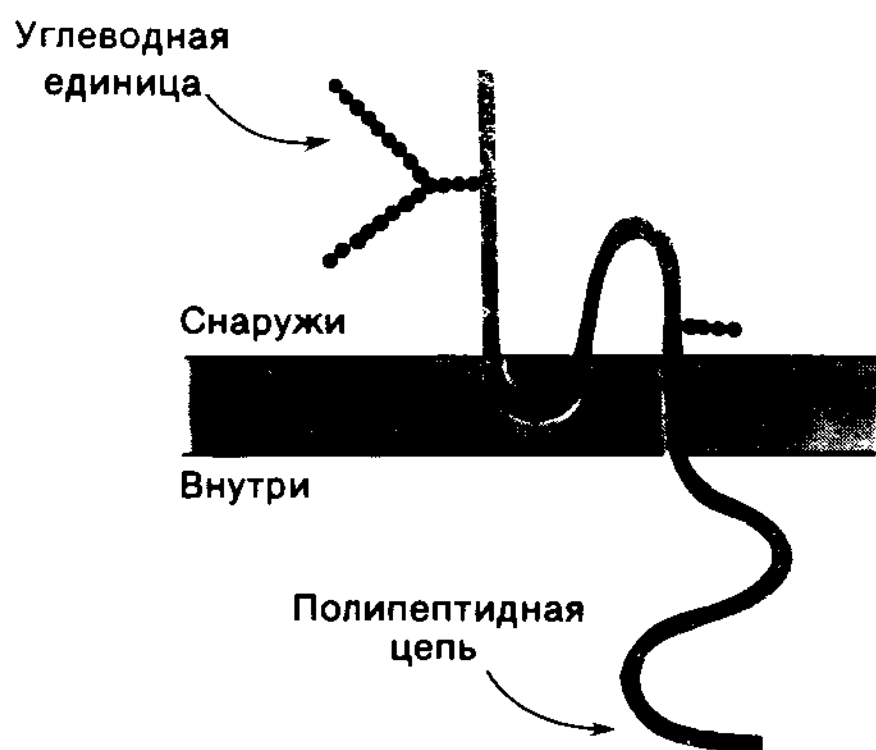


Рис. 10.23. Схема расположения белка полосы 3 (анионный канал) в мембране эритроцита. [Weinstein R.S., Khodadad J.K., Steck T.L., J. Supramol. Structure, **8**, 325 (1978).]

10.13. Липиды и многие мембранные белки быстро диффундируют в плоскости мембраны

Биологические мембраны – это не застывшие структуры. Напротив, и липиды, и многие белки мембран постоянно перемещаются в латеральном направлении. Быстрое движение белков мембраны выявляется с помощью флуоресцентной микроскопии при следующей постановке опыта. Культивируемые клетки человека и клетки мыши можно заставить слиться друг с другом; образующаяся при этом гибридная клетка называется *гетерокарион*. Одна часть плазматической мембраны гетерокариона происходит из клетки мыши, а другая – из клетки человека. Остаются ли мембранные белки мыши и человека разделенными в ге-

Снаружи

Бислой

Рис. 10.24. Последовательность аминокислот и трансмембранная локализация гликофорина А из эритроцитов. 15 углеводных единиц, присоединенных к остаткам серина и треонина, показаны светло-зеленым, а одна углеводная единица, присоединенная к боковой цепи аспарагина,– темно-зеленым. Гидрофобные аминокислотные остатки, погруженные в бислой, выделены желтым. С-концевая часть молекулы белка, расположенная внутри клетки, несет много отрицательно заряженных (красные) и положительно заряженных (синие) аминокислотных остатков. В числе углеводных единиц в N-концевой части белковой молекулы, лежащей вне клетки, много отрицательно заряженных групп сиаловой кислоты. (Печатается с любезного разрешения д-ра V. Marchesi.)

терокарионе или они смешиваются? Для ответа на этот вопрос использовали маркеры, а именно антитела с флуоресцентной меткой и далее визуально наблюдали за ними с помощью светового микроскопа. Антитело к мембранным белкам мыши имело зеленую флуоресценцию, а антитело к мембранным белкам человека – красную (рис. 10.26). В новообразованном гетерокарионе одна половина поверхности светилась зеленым, а другая – красным. Однако меньше чем через час (при 37°С) участки зеленой и красной флуоресценции полностью смешивались. Этот опыт показывает, что *мембранный белок способен диффундировать на*

Остатки сахара в гликопротеине

Вне клетки

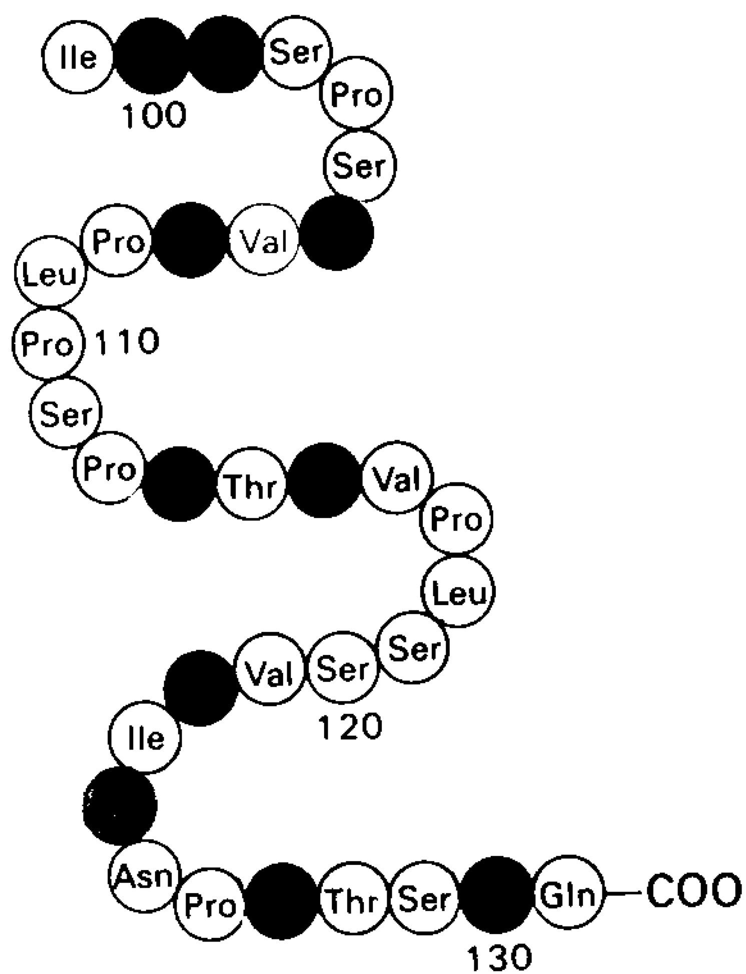
Остатки сахара в гликолипиде

Клеточная мембрана

Внутри клетки

Рис. 10.25. Углеводные остатки гликолипидов и гликопротеинов как правило, локализованы на наружной поверхности плазматических мембран клеток млекопитающих.

Внутри



расстояние порядка нескольких микрон примерно за 1 мин.

Более общий и количественный метод измерения латеральной диффузии мембранных компонентов в интактных клетках состоит в *определении скорости восстановления флуоресценции после тушения* (рис. 10.27). Для этого определенный компонент на поверхности клетки специфически метят флуоресцентным хромофором и помещают небольшую часть поверхности клетки (~ 3 мкм^2) в поле зрения флуоресцентного микроскопа. Далее, находящиеся в поле зрения флуоресцирующие молекулы разрушают мощным пучком лазерных лучей. После этого определяют время нового появления флуоресценции в поле зрения, используя только слабое освещение, чтобы избежать дополнительного тушения. Если меченый компонент подвижен, то обесцвеченные молекулы исчезнут из поля зрения, а их место займут флуоресцирующие молекулы; в итоге интенсивность флуоресценции в поле зрения возрастет. Скорость восстановления исходного уровня флуоресценции зависит от латеральной подвижности флуоресцентно-меченого компонента, которую можно выразить через коэффициент диффузии D. Среднее расстояние s (см), пройденное по плоскости за время t (с), зависит от D (см$^2 \cdot$с$^{-1}$) в соответствии с уравнением

$$s = (4Dt)^{1/2}.$$

Коэффициент диффузии липидов в различных мембранах составляет примерно 10^{-8} см$\cdot$с$^{-1}$. Таким образом, молекула фосфолипида диффундирует в среднем на расстояние $2 \cdot 10^{-4}$ см, или 2 мкм, за 1 с. Это означает, что *молекула липида может переместиться с одного конца бактериальной клетки на другой за 1 с.* Экспериментально установленная величина коэффициента диффузии показывает, что вязкость мембран примерно в 100 раз выше вязкости воды и близка к вязкости оливкового масла.

В отличие от липидов белки очень неоднородны в отношении латеральной подвижности. *Некоторые белки почти так же подвижны, как липиды, другие — практически неподвижны.* Так, фоторецепторный белок родопсин характеризуется очень высокой подвижностью: его коэффициент диффузии равен $4 \cdot 10^{-9}$ см$^2 \cdot$с$^{-1}$. С другой стороны, *фибронектин* (периферический гликопротеин, участвующий во взаимодействии клетки с субстратом) имеет коэффициент диффузии D менее 10^{-12} см$\cdot$с$^{-1}$. Малая подвижность некоторых белков, возможно, объясняется тем, что они закреплены на субмембранных цитоплазматических структурах.



Рис. 10.26. Схематическое изображение слияния клетки мыши и клетки человека с последующей диффузией мембранных компонентов в плоскости мембраны. Спустя несколько часов после слияния маркеры с зеленой и красной флуоресценцией полностью перемешиваются.

15 665

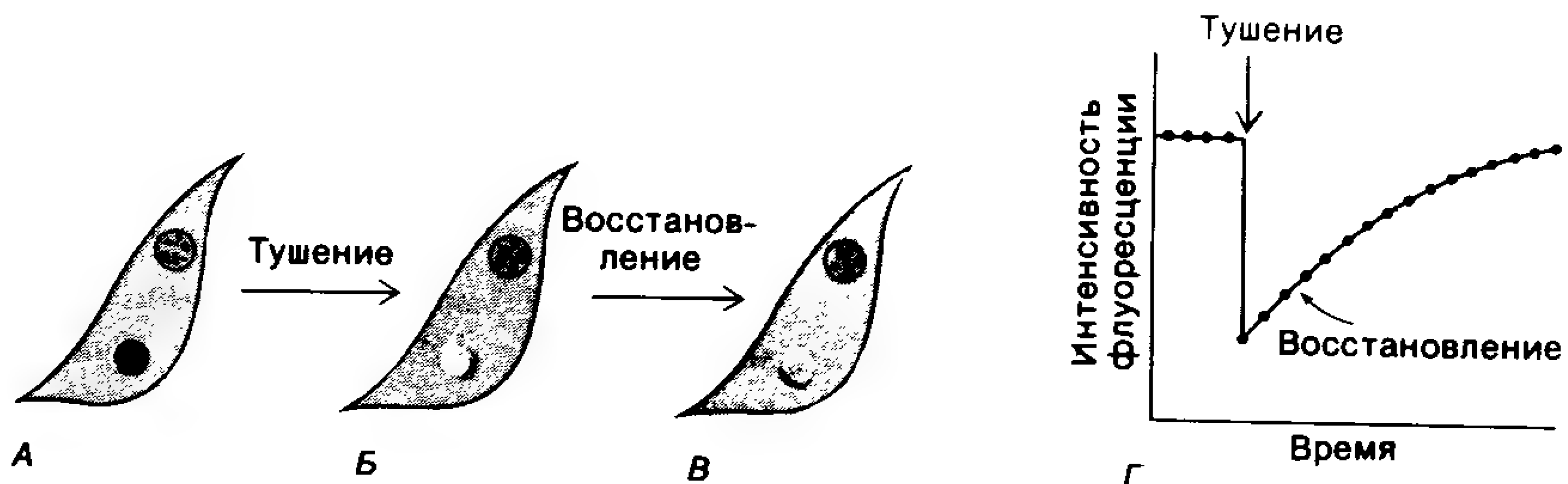


Рис. 10.27. Метод восстановления флуоресценции после фототушения. *А* – флуоресценция меченого компонента клеточной поверхности на небольшом освещенном участке клетки. *Б* – флуоресцирующие молекулы обесцвечивают интенсивной световой вспышкой. *В* – по мере того как в результате диффузии обесцвеченные молекулы выходят из освещенной области, а не подвергшиеся обесцвечиванию входят в нее, происходит восстановление флуоресценции до исходного уровня. *Г* – скорость восстановления зависит от коэффициента диффузии.

10.14. Мембранные белки не перемещаются поперек бислоев

В отличие от движения в плоскости мембраны спонтанное перемещение липидов от одной поверхности мембраны к другой происходит очень медленно. Перемещение молекулы с одной поверхности мембраны на другую называют *поперечной диффузией* (или "flip-flop"-перескок), тогда как диффузию молекул в плоскости мембраны называют *латеральной диффузией*. Методом электронного парамагнитного резонанса было проведено прямое определение поперечной диффузии фосфолипидных молекул в фосфатидилхолиновых пузырьках; оказалось, что *переход молекулы фосфолипида с одной стороны бислоя на другую совершается один раз за несколько часов* (описание эксперимента дано в конце главы в разделе «Вопросы и задачи», пункт 5). Таким образом, поперечная диффузия молекулы фосфолипида на расстояние 50 Å занимает в 10^9 раз больше времени, чем диффузия на то же расстояние в латеральном направлении.

Энергетический барьер для поперечной диффузии молекул белка еще выше, чем для липидов, поскольку в белках значительно больше полярных участков. *Проведенные исследования не выявили поперечной диффузии белка.* Следовательно, асимметрия мембран сохраняется на довольно длительное время.

10.15. Жидкостно-мозаичная модель биологических мембран

В 1972 г. Джонатан Сингер и Гарт Николсон (J. Singer, G. Nicolson) предложили жидкостно-мозаичную модель, объясняющую в общих чертах организацию биологических мембран. Согласно этой модели, мембраны представляют собой *двумерные растворы определенным образом ориентированных глобулярных белков и липидов* (рис. 10.28). В пользу предложенной модели свидетельствует большое количество экспериментальных данных. Основные положения жидкостно-мозаичной модели сводятся к следующему.

1. Бóльшая часть мембранных фосфолипидов и гликолипидов представлена в виде бислоя. Липидный бислой играет двоякую роль, будучи одновременно *растворителем* для интегральных белков мембраны и *барьером проницаемости*.

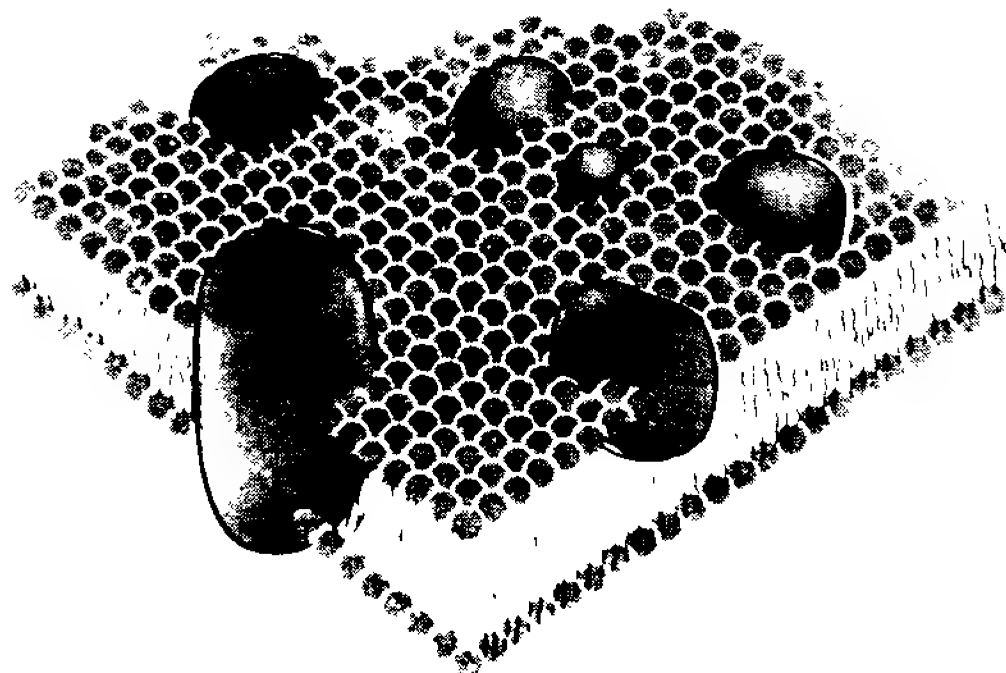


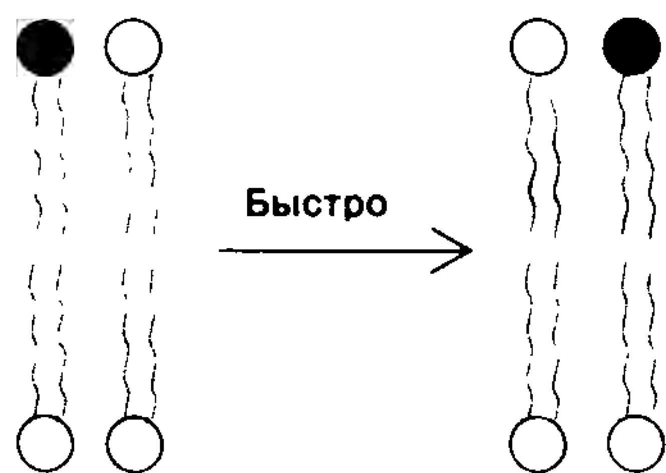
Рис. 10.28. Жидкостно-мозаичная модель. [Singer S. J., Nicolson G. L., Science, **175**, 723 (1972).]

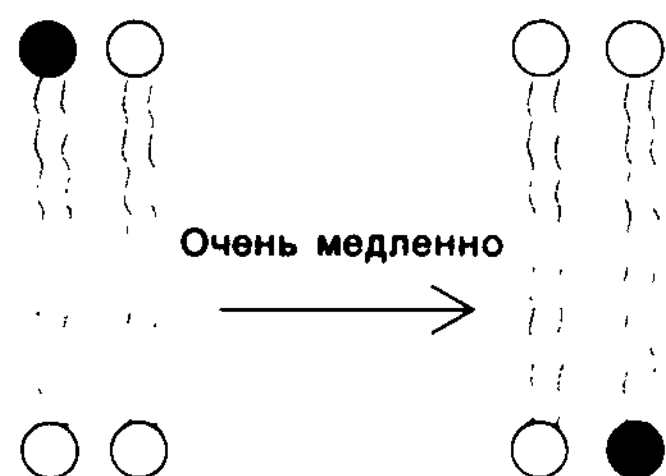
2. Небольшая часть мембранных липидов специфически связана с определенными мембранными белками и, вероятно, необходима для их функционирования.

3. Мембранные белки свободно диффундируют в липидном матриксе в латеральном направлении, но не могут перемещаться в поперечном направлении, т. е. от одной поверхности мембраны к другой.

10.16. Мембранам свойственна асимметрия

Мембраны асимметричны как по структуре, так и по функциям; об этом свидетельствуют примеры ориентации гликофорина и анионного канала, а также – более общий случай – локализация углеводов на наружной поверхности мембран. Наружная и внутренняя поверхности *всех известных биологических мембран различаются по составу и ферментативной активности.* Яркой иллюстрацией этого положения может служить насос, регулирующий концентрации Na^+ и K^+ в клетках. Эта транспортная система имеется в плазматических мембранах почти всех клеток высших организмов. Na^+-K^+-насос ориентирован в плазматической мембране таким образом, что выводит Na^+ из клетки и насасывает K^+ в клетку (рис. 10.29). Для работы насоса требуется также АТР, который должен находиться на внутренней стороне мембраны. Специфический ингибитор насоса уабаин эффективен





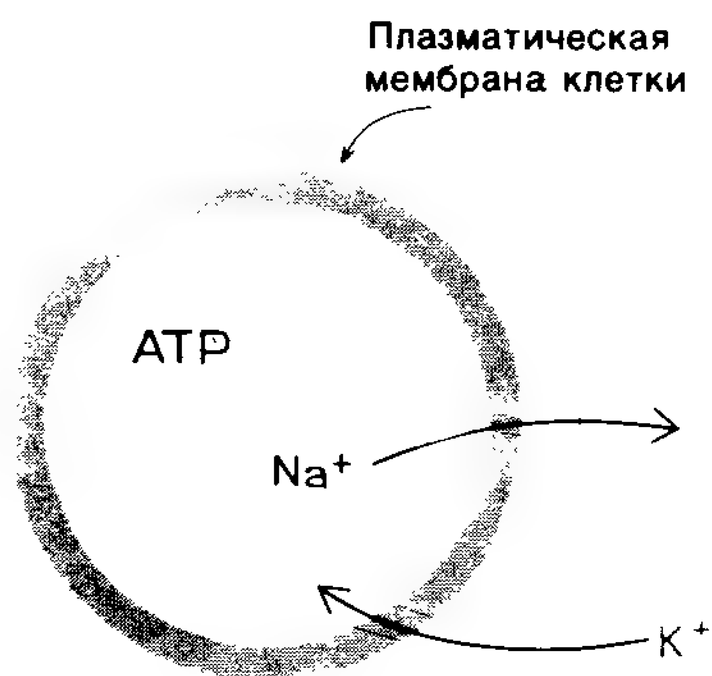


Рис. 10.29. Асимметрия системы сопряженного транспорта Na^+ и K^+ в плазматических мембранах.

только при воздействии с наружной стороны мембраны.

Как будет рассмотрено более подробно в одной из следующих глав (разд. 29.32), строго определенная ориентация мембранных белков обусловлена тем, что они синтезируются и включаются в мембрану асимметричным образом. Эта абсолютная асимметрия сохраняется благодаря отсутствию трансмембранных перемещений белков на всем протяжении их существования в мембране. Липиды также распределены асимметрично, что обусловлено механизмом их биосинтеза, однако эта асимметрия практически во всех случаях, кроме гликолипидов, не является абсолютной. Например, в мембране эритроцита сфингомиелин и фосфатидилхолин расположены преимущественно в наружном слое бислоя, тогда как фосфатилэтаноламин и фосфатидилсерин главным образом – во внутреннем. Холестерол в большом количестве присутствует в обоих слоях бислоя. Функциональное значение асимметрии липидов пока еще не ясно.

10.17. Текучесть мембран зависит от состава жирных кислот и содержания холестерола

В мембранном бислое цепи жирных кислот в молекулах липидов могут находиться либо в строго упорядоченном жестком, либо в относительно дезорганизованном, жидком состоянии. В упорядоченном состоянии все связи С—С имеют *транс*-конформацию, тогда как в неупорядоченном – *гош*-конформацию (рис. 10.30).

Переход от твердого (полностью *транс*-) к жидкому (частично *гош*-) состоянию про-

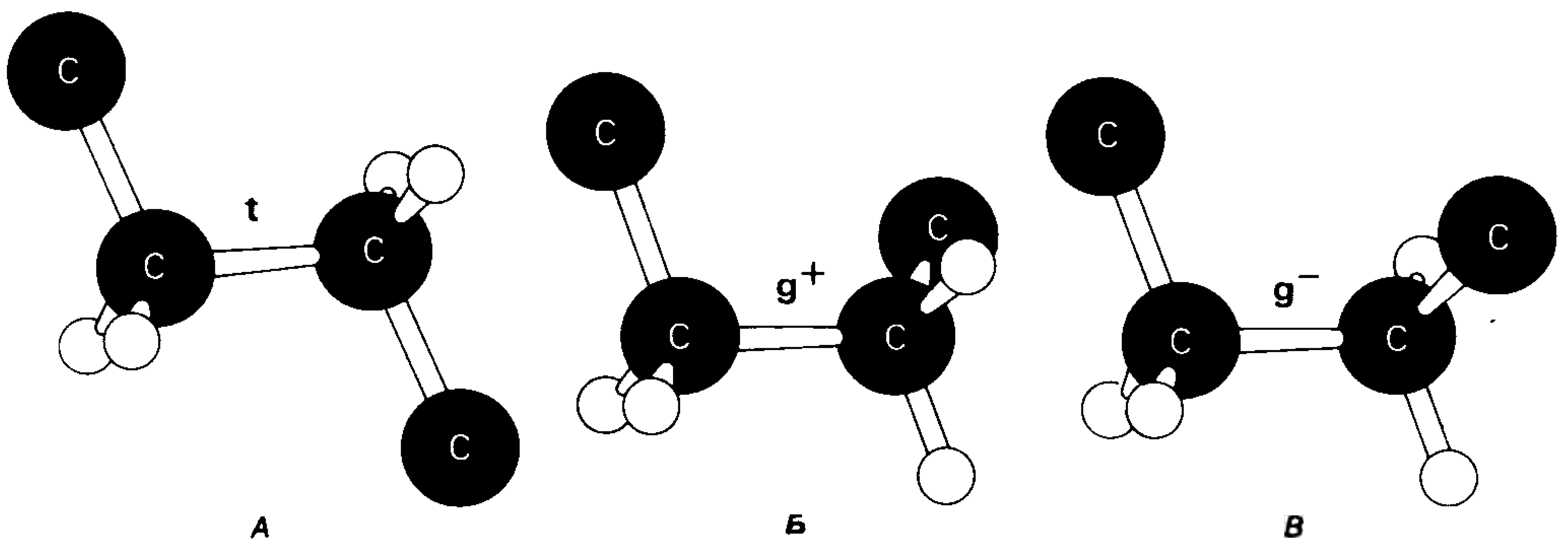


Рис. 10.30. Конформация связей С—С в углеводородных цепях остатков жирных кислот. *А – транс* (t)-конформация. *Б* и *В* – поворот на 120° дает гош (g)-конформацию, которая может быть g^+ (поворот по часовой стрелке) или g^- (поворот против часовой стрелки). При гош-конформации углеводородная цепь изгибается под углом 120°.

исходит при повышении температуры выше точки плавления $T_{пл}$. *Этот температурный переход зависит от длины цепи и степени ненасыщенности ацильного остатка.* Наличие насыщенных ацильных остатков благоприятствует жесткому состоянию, так как прямые углеводородные цепи легко взаимодействуют между собой (рис. 10.31, *А*). *Наличие же двойной связи цис-конфигурации приводит к изгибу углеводородной цепи, из-за которого нарушается строгая упорядоченность укладки ацильных остатков,* и в результате $T_{пл}$ снижается (рис. 10.31, *Б*). Тем-

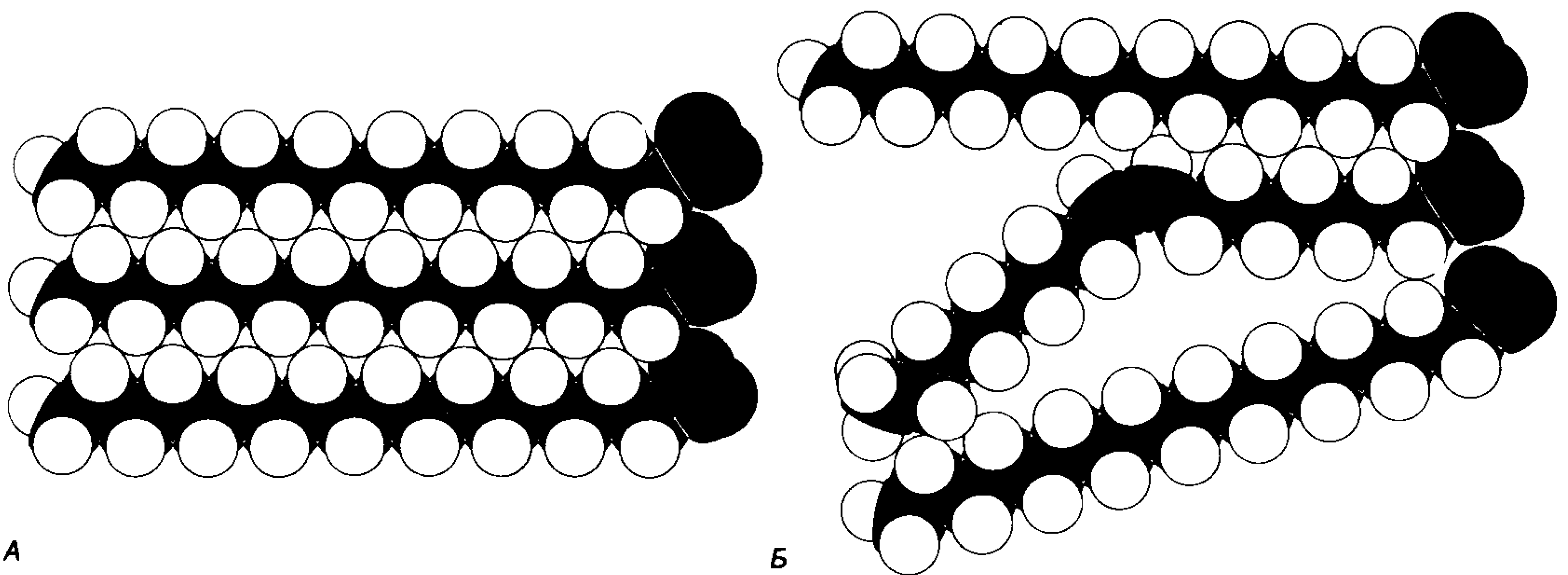


Рис. 10.31. Наличие двойных связей *цис*-конфигурации нарушает высокую степень упорядоченности упаковки углеводородных цепей жирных кислот. На приведенных пространственных моделях показана упаковка: *А* – трех молекул стеарата (C_{18}, насыщенный), *Б* – молекулы олеата (C_{18}, ненасыщенный) между двумя молекулами стеарата.

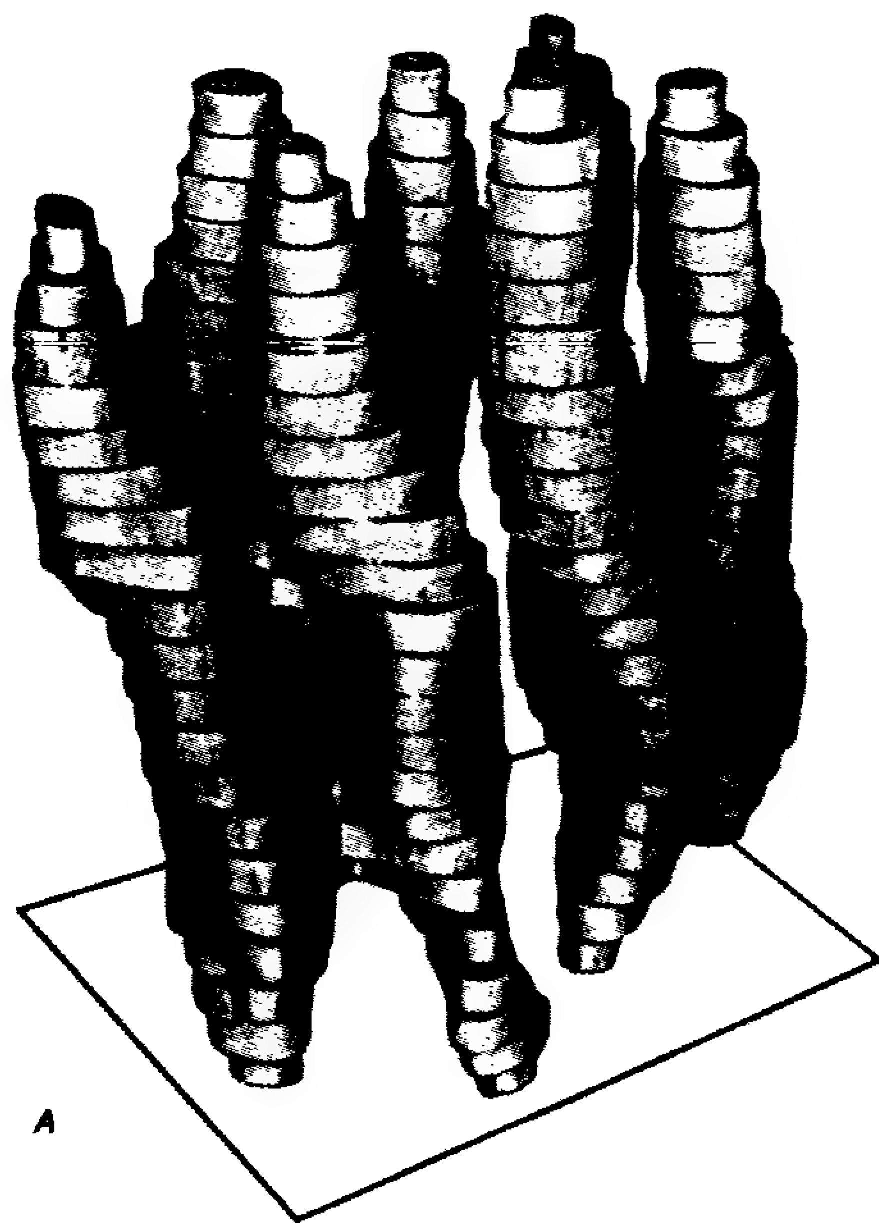
пература перехода из жесткого состояния в жидкое зависит также от длины цепи. Длинные углеводородные цепи образуют более прочные связи друг с другом, чем короткие. В частности, каждая дополнительная группа —CH_2— изменяет свободную энергию связи двух прилежащих углеводородных цепей на – 0,5 ккал/моль.

Прокариоты регулируют текучесть своих мембран путем изменения числа двойных связей и длины ацильных цепей. Так, соотношение насыщенных и ненасыщенных остатков жирных кислот в мембране *E. coli* снижалось с 1,6 до 1,0 при понижении температуры среды с 42 до 27°С. Такое

уменьшение доли насыщенных жирных кислот предотвращает чрезмерное затвердевание мембраны при пониженной температуре. *У эукариот ключевым регулятором текучести мембран является также холестерол.* Находясь между ацильными цепями, холестерол препятствует их кристаллизации. В сущности, из-за холестерола исчезает фазовый переход. С другой стороны, холестерол стерически блокирует сильное перемещение ацильных цепей и тем самым снижает текучесть мембран. Таким образом, благодаря этим взаимопротивоположным эффектам холестерола текучесть мембран поддерживается на каком-то среднем уровне.

10.18. Трехмерная модель мембран по данным электронной микроскопии

Как мы видели на примерах переносчиков кислорода и ферментов, описанных в предыдущих главах, рентгеноструктурный анализ является надежным методом изучения трехмерной структуры растворимых белков. Применим ли рентгеноструктурный анализ к мембранным белкам? Трудность заключается в том, что до сих пор не удавалось получить интегральных белков мембраны в виде трехмерных кристаллов. Однако некоторые мембранные белки образуют правильную решетку в плоскости мембраны, т.е. двумерные кристаллы. Структурный анализ этих кристаллоидных форм удается осуществить с помощью электронной микроскопии; в частности, такое исследование было с успехом проведено на *пурпурной мембране Halobacterium halobium* – бактерии, обитающей в соленой среде. Пурпурная мембрана – это специализированная область клеточной мембраны, содержащая *бактериородопсин* – белок массой 25 кДа, который превращает энергию света в трансмембранный протонный градиент, используемый для синтеза ATP (разд. 19.21). Были получены кристаллоиды в виде листка, или диска, диаметром до 1 мкм. Благодаря тому что в каждом из них содержалось около 20 000 молекул бактериородопсина, можно было получить изображение, используя очень слабый пучок электронов и тем самым сводя к минимуму радиационные повреждения. Кроме того, для получения изображения с высокой степенью разрешения можно было брать неокрашенные препараты. Одно электронно-микроскопическое изображение кристаллоидного листка пур-



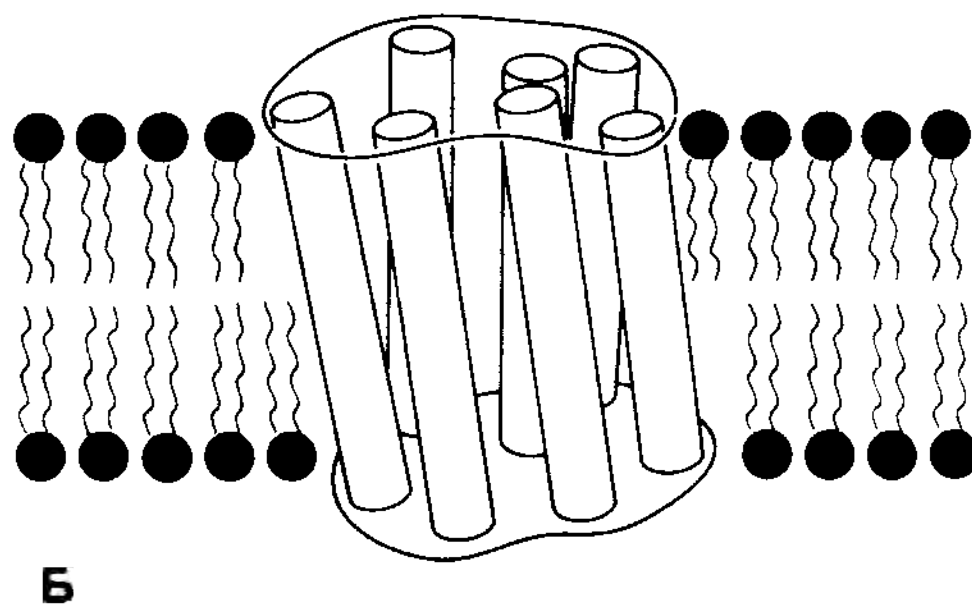


Рис. 10.32. *А* – модель бактериородопсина, сконструированная по данным трехмерной карты с разрешением 7 Å. *Б* – схема для пояснения; показано размещение α-спирализованных участков в липидном бислое. Связи между этими спиралями в настоящее время еще не определены. (Печатается с любезного разрешения д-ра R. Henderson и д-ра N. Unwin.) Заказ 665. стр. 39–43 Голдобина С.

пурной мембраны дает вид структуры, спроецированной на плоскость. Следующий этап – получение изображений последовательных срезов и обработка информации, заключенной примерно в 20 снимках, методом рядов Фурье.

Используя описанный подход, Ричард Хендерсон и Нигел Ануин (R. Henderson, N. Unwin) сконструировали трехмерную модель пурпурной мембраны с разрешением 7 Å (рис. 10.32). *Белки этой мембраны содержат семь плотно упакованных α-спиралей, которые идут почти перпендикулярно плоскости мембраны, занимая по ширине около 45 Å.* Пространство между молекулами белка заполнено липидным бислоем. Вполне вероятно, что принцип структурной организации пурпурной мембраны использован и в организации других интегральных белков. Предполагается, в частности, что мембранные насосы и каналы содержат α-спирализованные участки, пронизывающие бислой.

Заключение

Биологические мембраны представляют собой плоские структуры шириной порядка 75 Å, которые состоят из молекул белков и липидов, удерживаемых вместе нековалентными связями. Мембраны служат барьерами проницаемости с высокой степенью избирательности. Они отграничивают замкнутые пространства (компартменты) в виде целых клеток или субклеточных органелл. Встроенные в мембраны насосы и каналы регулируют молекулярный и ионный состав этих компартментов. Мембраны регулируют также обмен информацией между клетками. В частности, на некоторых мембранах находятся рецепторы гормонов, например рецепторы инсулина. Кроме того, мембраны непосредственно участвуют в таких процессах превращения энергии, как фотосинтез и окислительное фосфорилирование.

Основные классы мембранных липидов – это фосфолипиды, гликолипиды и холестерол. К классу фосфолипидов относятся фосфоацилглицеролы, построенные из глицеролового скелета, двух цепей жирных кислот и фосфорилированного спирта. Цепи жирных кислот содержат обычно от 14 до 24 атомов углерода и могут быть как насыщенными, так и ненасыщенными. Основные фосфоацилглицеролы – фосфатидилхолин, фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин. К фосфолипидам другого типа принадлежит сфингомиелин, основу скелета которого составляет не глицерол, а сфингозин. Гликолипиды представлены углеводсодержащими липидами – производными сфингозина. Все мембранные липиды – амфипатические соединения. В водных растворах они спонтанно образуют обширный бимолекулярный слой, состоящий из гидрофильной и гидрофобной фаз. Липидные бислои характеризуются крайне низкой проницаемостью для ионов и большинства полярных соединений; в то же время бислой жидкий, что позволяет ему служит растворителем для мембранных белков.

Отдельные функции мембран, такие, как транспорт, коммуникация, преобразование энергии, выполняются специфическими белками. Некоторые мембранные белки погружены в глубь углеводородной части липидного бислоя. Трансмембранные белки, в частности белок полосы 3 из мембраны эритроцитов, могут служить ионными каналами. Мембраны ассимметричны структурно и функционально; это проявляется как в направленности действия систем транспорта ионов, так и в локализации углеводных остатков только на наружной стороне плазматических мембран клеток млекопитающих. Мембраны – динамичные структуры, и в отсутствие специальных ограничений составляющие их белки и липиды быстро диффундируют в плоскости мембраны (латеральная диффузия). Однако переход белков и липидов с одной стороны мембраны на другую (поперечная диффузия, «flip-flop»-перескок) происходит крайне медленно. Степень текучести мембран частично зависит от длины цепей и степени ненасыщенности составляющих их жирных кислот.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Singer S. J., Nicolson G. L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, Science, **175**, 720–731.

Raff M. C., 1976. Cell-surface immunology, Sci. Amer., **234** (5), 30–39. (Ясно написанная и хорошо иллюстрированная статья, в которой показано, как антибиотики используются для изучения структуры и динамики клеточной поверхности.)

Rothman J. E., Lenard J., 1977. Membrane asymmetry, Science, **195**, 743–753.

Монографии и обзоры

Bretscher M. S., Raff M. C., 1975. Mammalian plasma membranes, Nature, **258**, 43–49.

Bretscher M. S., 1973. Membrane structure: some general principles, Science, **181**, 622–629.

Ashwell G., Morell A. G., 1977. Membrane glycoproteins and recognition phenomena, Trends Biochem. Sci., **2**, 76–78.

Tyrrell D. A., Heath T. D., Colley C. M., Ryman B. E., 1976. New aspects of liposomes, Biochim. Biophys. Acta, **457**, 259–302.

Poste G., Nicolson G. L. (eds.), 1977. Dynamic Aspects of Cell Surface Organization, North-Holland. (Содержит статьи, посвященные динамике мембран, иммунологии клеточной поверхности, а также изменениям белков клеточной поверхности в процессах роста и злокачественного перерождения.)

Tanford C., 1980. The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes, 2nd ed., Wiley-Interscience. (Ясное изложение термодинамических аспектов структурной организации мембран.)

Динамика мембран

Frye C. D., Edidin M., 1970. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons, J. Cell Sci., **7**, 319–335.

Kornberg R. D., McConnell H. M., 1971. Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes, Biochemistry, **10**, 1111–1120.

Cone R. A., 1972. Rotational diffusion of rhodopsin in the visual receptor membrane, Nature New Biol., **236**, 39–43.

Poo M., Cone R. A., 1974. Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane, Nature, **247**, 438–441.

Elson E. L., Schlessinger J., 1979. Long-range motions on cell surfaces. In: Schmitt F. O. and Worden F. G. (eds.), The Neurosciences: Fourth Study Program, pp. 691–701, MIT Press. (Обсуждение метода восстановления флуоресценции после фототушения и использование этого метода для измерения латеральной диффузии компонентов клеточной поверхности.)

Seelig A., Seelig J., 1977. Effect of a single cis double bond on the structure of a phospholipid bilayer, Biochemistry, **16**, 45–50.

Электронная микроскопия мембран

Branton D., 1966. Fracture faces of frozen membranes, Proc. Nat. Acad. Sci., **55**, 1048–1056.

Henderson R., Unwin P. N. T., 1975. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy, Nature, **257**, 28–32. (Впервые полученное изображение мембранного белка. При разрешении 7 Å отчетливо видны трансмембранно расположенные спирали.)

Unwin P. N. T., Henderson R., 1975. Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crustalline specimens, J. Mol. Biol., **94**, 425–440. (Описание общего подхода для экспериментального определения структуры мембранных белков, образующих высокоупорядоченные двумерные структуры.)

Мембрана эритроцита

Steck T. L., 1974. The organization of proteins in the human red blood cell membrane, J. Cell Biol., **62**, 1–19.

Marchesi V. T., Furthmayr H., Tomita M., 1976. The red cell membrane, Ann. Rev. Biochem., **45**, 667–698.

Steck T. L., 1978. The band 3 protein of the human red cell membrane: a review, J. Supramol. Struct., **8**, 311–324.

Синтетические и реконструированные мембраны

Fleisher S., Packer L. (eds.), 1974. Methods in Enzymology, vol. 32, Academic Press. (Содержит прекрасные статьи по методам изучения мембран, в том числе по технике получения модельных и реконструированных мембран.)

Darszon A., Vandenberg E. A., Ellisman M. H., Montal M., 1979. Incorporation of membrane proteins into large single bilayer vesicles, J. Cell Biol., **81**, 446–452.

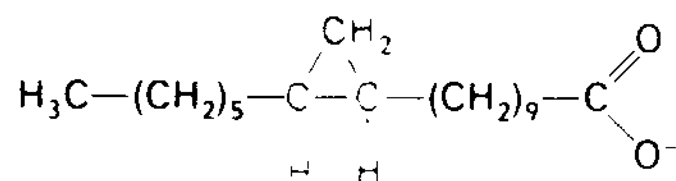
Racker E., 1977. Perspectives and limitations of resolutions-reconstitution experiments, J. Supramol. Struct., **6**, 215–228.

Вопросы и задачи

1. Сколько молекул фосфолипидов содержится в 1 мкм² фосфолипидной двуслойной мембраны? Предположим, что одна молекула фосфолипида занимает площадь 70 Å².

2. Жирные кислоты, входящие в состав бактериальных фосфолипидов, содержат циклопропановое кольцо.

Какое влияние должно оказывать циклопропановое кольцо на упаковку углеводородных цепей внутри бислоя? Будут ли такие циклопропановые жирные кислоты повышать или понижать текучесть мембран?



3. Какое в среднем расстояние проходят мембранные липиды за 1 мкс, 1 мс и 1 с? Коэффициент диффузии можно принять равным 10^{-8} см²·с⁻¹.

4. Коэффициент диффузии D жесткой сферической молекулы задается уравнением

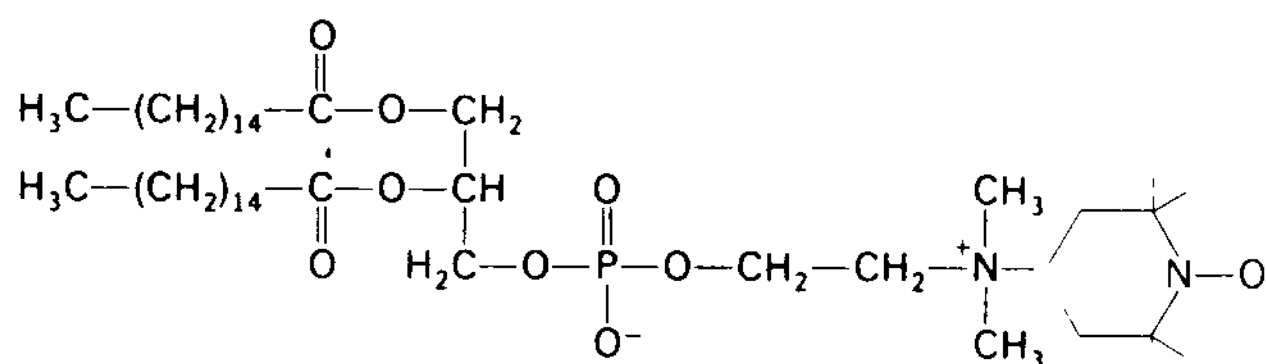
$$D = kT(6\pi\eta r),$$

где η – вязкость растворителя, r – радиус сферы, k – константа Больцмана ($1{,}38 \cdot 10^{-6}$ эрг/град), T – абсолютная температура. Чему равен коэффициент диффузии при 37°С белка массой 100 кДа в мембране, эффективная вязкость которой составляет 1 пуаз (1 пуаз = 1 эрг · с/см^3)? Какое в среднем расстояние проходит этот белок за 1 мкс, 1 мс, 1 с? Предположим, что белок является негидратированной, жесткой сферической частицей с плотностью 1,35 г/см^3.

5. Корнберг и Мак-Коннелл (R. D. Kornberg, H. M. McConnell, 1971) исследовали поперечную диффузию фосфолипидов в двуслойной мембране, используя парамагнитный аналог фосфатидилхолина, так называемый *спин-меченный фосфатидилхолин*:

Группа оксида азота (NO) в спин-меченном фосфатидилхолине дает четкий парамагнитный резонансный спектр. Если в присутствии восстанавливающих агентов, например аскорбата, соединения оксида азота превращаются в амины, то этот спектр исчезает.

Путем обработки ультразвуком и последующей очистки методом гель-фильтрации были получены липидные пузырьки, состоящие из фосфатидилхолина (95%) и спин-меченного аналога (5%). Наружный диаметр этих липосом составлял около 250 Å. Спустя несколько минут после добавления аскорбата амплитуда парамагнитного резонансного спектра снижалась до 35% первоначального уровня. После добавления второй аликвоты аскорбата не происходило заметных изменений спектра на протяжении нескольких минут, однако далее амплитуда этого остаточного спектра затухала по экспоненте с полупериодом 6,5 ч. Как объяснить эти изменения амплитуды парамагнитного спектра?



ОТВЕТЫ НА ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ

Глава 2

1. а) Фенилизотиоцианат.
   б) Дансилхлорид.
   в) Мочевина; β-меркаптоэтанол для восстановления дисульфидов.
   г) Химотрипсин.
   д) CNBr.
   е) Трипсин.
2. а) 3; б) 12; в) 4,28; г) 9,8; д) 2,4.
3. 0,01; 0,1; 1; 10; 100.
4. 477 Å (318 остатков на цепь; 1,5 Å на остаток).
5. Каждый аминокислотный остаток, за исключением С-концевого, при реакции с гидразином дает гидразид. С-концевой остаток можно идентифицировать по тому признаку, что он дает свободную аминокислоту.
6. а) Примерно +1.
   б) Два пептида.
7. Боковая цепь S-аминоэтилцистеина схожа с боковой цепью лизина; единственное различие заключается в том, что в молекуле S-аминоэтилцистеина вместо метиленовой группы стоит атом серы.
8. Нативная конформация инсулина – термодинамически не самая стабильная форма. Обсуждение этого вопроса см. в разд. 35.9.

Глава 3

1. а) $2{,}96 \cdot 10^{-11}$ г.
   б) $2{,}71 \cdot 10^{8}$ молекул.
   в) Нет. Если бы гемоглобин находился в виде кубических кристаллов, то в одном эритроците умещалось бы $3{,}22 \cdot 10^{8}$ молекул. Следовательно, реальная плотность упаковки гемоглобина в эритроците составляет 84% от максимально возможной.
2. 2,65 г (или $4{,}75 \cdot 10^{-2}$ моль) Fe.
3. а) У человека $1{,}44 \cdot 10^{-2}$ г ($4{,}49 \cdot 10^{-4}$ моль) O_2 на 1 кг мышц. У кашалота 0,144 г ($4{,}49 \cdot 10^{-3}$ моль) O_2 на 1 кг мышц.
   б) 128.
4. а) Примерно +36 при pH 2, +4 при pH 7 и +2 при pH 9.
   б) Примерно 10. Однако имеет место взаимодействие титрующихся групп, поэтому действительная изоэлектрическая точка равна 8,2. Этот вопрос блестяще разбирается в статье Shire S. J., Hanania G. I. H., Gurd F. R. N., Biochemistry, **13**, 2967 (1974).
5. а) Три пептида, состоящие из остатков от 1 до 55, от 56 до 131 и от 132 до 153.
   б) Короткие α-спирали мало стабильны в водном растворе. В миоглобине они стабилизированы третичными взаимодействиями.
6. $\lg \frac{[MbO_2]}{[Mb]} = \lg pO_2 - \lg P_{50}$.
7. а) $k_{отщепления} = 20\ с^{-1}$.

$$K \frac{[Mb][O_2]}{[MbO_2]} = \frac{K_{отщепления}}{K_{присоединения}}$$

   б) Средняя продолжительность равна 0,05 с (величина, обратная $k_{отщепления}$).
8. Раствор миоглобина 1 мг/мл (масса миоглобина = 17,8 кДа соответствует концентрации $5{,}62 \cdot 10^{-5}$ М. Светопоглощение этого раствора при длине оптического пути 1 см составляет 0,84, что соответствует отношению I_0/I, равному 6,96. Следовательно, через раствор проходит 14,4% падающего света.

Глава 4

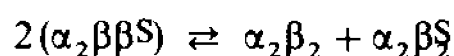
1. а) Увеличит.
   б) Снизит.
   в) Снизит.
   г) Снизит сродство к кислороду.
2. а и б) Свяжется меньше H^+.
3. Инозитолгексафосфат.
4. а) $\Delta Y = 0{,}977 - 0{,}323 = 0{,}654$,
   б) $\Delta Y = 0{,}793 - 0{,}434 = 0{,}359$.
5. а) pK снизится.
   б и в) pK увеличится.
6. Дополнительная метильная группа препятствует перемещению атома железа в плоскость порфирина при оксигенировании. Это модельное соединение имитирует Т-состояние гемоглобина. Интересное обсуждение этого вопроса можно найти в статье Collman J. P., Brauman J. I., Doxsee K. M., Halbut T. R., Suslick K. S., Proc. Nat. Acad. Sci, **75**, 564 (1978).
7. а) Да. $K_{AB} = K_{BA}(K_B/K_A) = 2 \cdot 10^{-5}$ М.
   б) Наличие А повышает связывание В и аналогично присутствие В повышает связывание А.

8. Оксид углерода, присоединившись к одному гему, изменяет сродство к кислороду других гемов в той же молекуле гемоглобина. В частности, CO повышает сродство гемоглобина к кислороду и тем самым снижает количество O_2, высвобождаемое в тканях. Оксид углерода оказывает стабилизирующее действие на характеристики четвертичной структуры оксигемоглобина. Другими словами, CO имитирует O_2 в качестве аллостерического эффектора.

9. а) Транспорт максимален при $K = 10^{-5}$ M. В общем случае транспорт достигает максимума при $K = \sqrt{L_A L_B}$.
б) Максимальный перенос кислорода при $P_{50} = 44,7$ торр, что значительно выше, чем 26 торр – величина, характерная для физиологических условий. Следует подчеркнуть, что в этом расчете не учитываются кооперативность связывания и эффект Бора.

Глава 5

1. а) Лизин или аргинин в положении 6.
б) При pH 8 этот гемоглобин будет двигаться к аноду медленнее двух других гемоглобинов, поскольку у него наименьший общий отрицательный заряд.
2. а) HbC; б) HbD; в) HbJ; г) HbN.
3. Мутации гена α влияют на все три гемоглобина, поскольку эти гемоглобины имеют соответственно следующие субъединичные структуры: $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_2\delta_2$ и $\alpha_2\gamma_2$. Мутации генов β, δ и γ скажутся только на одном из типов гемоглобина.
4. Реакция

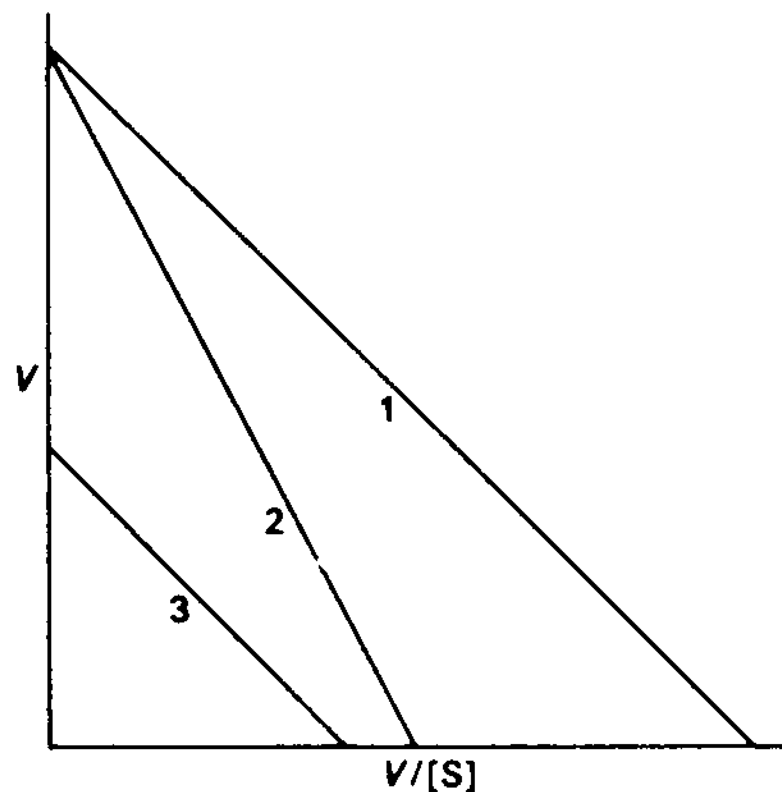


$$2(\alpha_2\beta\beta^S) \rightleftarrows \alpha_2\beta_2 + \alpha_2\beta_2^S$$

протекает быстро по сравнению со временем проведения электрофореза. Разделение $\alpha_2\alpha_2$ и $\alpha_2\alpha_2^S$ в электрическом поле сдвигает равновесие реакции вправо.
5. Дезокси-HbA содержит комплементарный участок и поэтому может присоединиться к волокну дезокси HbS. Дальнейшее удлинение волокна будет уже невозможным, так как в концевой молекуле дезокси-HbA нет липкого участка.
6. Свойственная дезоксигемоглобину A водородная связь между аспартатом и тирозином в участке $\alpha_1\alpha_2$-контакта отсутствует в гемоглобине Kempsey (с. 100). Следовательно, дезоксиформа этого мутантного гемоглобина должна легче диссоциировать на димеры, чем нормальный гемоглобин. С другой стороны, оксигенированные формы обоих гемоглобинов диссоциируют примерно одинаково, поскольку указанная водородная связь не участвует в стабилизации ни того, ни другого гемоглобина.

Глава 6

1. а) $31,1 \cdot 10^{-6}$ моль.
б) $5 \cdot 10^{-8}$ моль.
в) $622\ с^{-1}$.
2. а) Да. $K_M = 5,2 \cdot 10^{-6}$ M.
б) $V_{макс} = 6,84 \cdot 10^{-10}$ моль.
в) $337\ с^{-1}$.
3. а) В отсутствие ингибитора $V_{макс} = 47,6$ мкмоль/мин и $K_M = 1,1 \cdot 10^{-5}$ M. В присутствии ингибитора $V_{макс}$ не меняется, а кажущаяся $K_M = 3,1 \cdot 10^{-5}$ M.
б) Конкурентное ингибирование.
в) $1,1 \cdot 10^{-3}$ M.
г) $f_{ES} = 0,243$ и $f_{EI} = 0,488$.
д) В отсутствие ингибитора $f_{ES} = 0,73$, а в присутствии $2 \cdot 10^{-3}$ M ингибитора $f_{ES} = 0,49$. Соотношение этих величин, равное 1,49, эквивалентно соотношению скоростей реакции в тех же условиях.
4. а) $V_{макс} = 9,5$ мкмоль/мин. $K_M = 1,1 \cdot 10^{-5}$ M, так же как и в отсутствие ингибитора.
б) Неконкурентное.
в) $2,5 \cdot 10^{-5}$ M.
г) 0,73 как в присутствии, так и в отсутствие ингибитора.
5. а) $V = V_{макс} - (V/[S])K_M$.
б) Наклон $= -K_M$; пересечение с осью y равно $V_{макс}$; пересечение с осью x соответствует $V_{макс}/K_M$.
в)
1 – без ингибитора,
2 – конкурентный ингибитор,
3 – неконкурентный ингибитор.



6. Связывание конкурентного ингибитора в одном активном центре аллостерического фермента может привести к повышению сродства к субстрату другого участка в той же молекуле фермента. В соответствии с моделью согласованного механизма такой конкурентный ингибитор способствует переходу T → R.

7. Потенциально при образовании водородных связей при pH 7 донорами могут служить боковые цепи следующих аминокислотных остатков: аргинина, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, серина, треонина, триптофана и тирозина.

8. Скорости использования A и B задаются уравнениями

$$V_A = \left(\frac{k_3}{K_M}\right)[E][A]$$

и

$$V_B = \left(\frac{k_3}{K_M}\right)_B [E][B].$$

Отсюда соотношение скоростей равно

$$V_A/V_B = \left(\frac{k_3}{K_M}\right)_A [A] / \left(\frac{k_3}{K_M}\right)_B [B].$$

Следовательно, фермент выбирает тот или иной из конкурирующих субстратов в зависимости от значения k_3/K_M, а не только K_M.

Глава 7

1. Быстрее всех гидролизуется (б), медленнее всех – (а).
2. а) B—C; б) A—B и E F; в) A—B -C (один остаток сахара не взаимодействует с ферментом, вследствие чего участок D как энергетически невыгодный остается незанятым.
3. ^{18}O окажется в гидроксильной группе при C-4 в ди-NAG (остатки E—F).
4. Этот аналог, будучи лишен громоздкого заместителя при C-5, может, по-видимому, связываться в участке D, не претерпевая деформации. Отсюда следует, что связывание остатка D данного аналога в отличие от связывания остатка D, принадлежащего тетра-NAG, не требует притока свободной энергии. См. van Eikeren P., Chipman D. M., J. Am. Chem. Soc., **94**, 4788 (1972).
5. а) В оксигемоглобине Fe связан с пятью атомами азота и одним атомом кислорода. В карбоксипептидазе A Zn связан с двумя атомами азота и двумя атомами кислорода.
б) В оксимиоглобине один из атомов азота, связанных с Fe, принадлежит проксимальному остатку гистидина, а остальные четыре – гему. Атом кислорода, связанный с Fe, происходит из O_2. В карбоксипептидазе A два атома азота, координационно связанные с Zn, принадлежат остаткам гистидина. Один из связанных с Zn атомов кислорода принадлежит глутаматной боковой цепи, второй – молекуле воды.
в) Аспартат, цистеин и метионин.
6. Вода, меченная ^{18}O, образуется в случае, если карбоксипептидаза A катализирует *синтез* пептидной связи между N-бензоилглицином и L-фенилаланином. В присутствии L-β-фенилмолочной кислоты ^{18}O не включается в H_2O, поскольку в этом соединении нет аминогрупп и потому синтез пептидной связи не идет. Обсуждение этих опытов см. Breslow R., Wernick D. L., Proc. Nat. Acad. Sci., **74**, 1303 (1977).

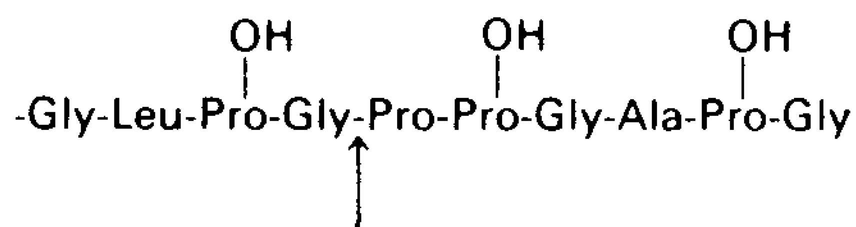
Глава 8

1. а) Карбоксипептидаза A.
б) Лизоцим и карбоксипептидаза A.
в) Химотрипсин.
г) Карбоксипептидаза A и химотрипсин.
2. а) Да.
б) В химотрипсине – гистидин-57, в лизоциме – глутамат-85, в карбоксипептидазе A – тирозин-248.
3. В химотрипсине – серин-195, в карбоксипептидазе A – глутамат-270 (или гидроксильный ион).
4. Точное расположение участвующих в катализе остатков и субстратов, геометрическое растяжение (деформация субстрата), перемещение электронов и десольватация субстрата.
5. а) Тозил-L-лизилхлорометилкетон (ТЛХК).
б) Сначала определите, способны ли субстраты предотвратить инактивацию трипсина под действием ТЛХК. Затем проверьте, способен ли D-изомер ТЛХК инактивировать трипсин.
в) Тромбин.
6. а) Серин.
б) Полуальдегид между альдегидной группой ингибитора и гидроксильной группой серина в активном центре.
7. Атом бора присоединяется к атому кислорода, принадлежащему серину в активном центре. Геометрия образующегося тетраэдрического промежуточного продукта аналогична переходному состоянию.
8. Активированный фактор X остается связанным с мембранами тромбоцитов, что ускоряет активацию им протромбина.
9. Антитромбин III, по-видимому, аналог переходного состояния, поэтому для его взаимодействия с тромбином требуется полностью сформированный активный центр.
10. Аминокислотные остатки *a* и *d* расположены внутри α-спирализованной суперспирали, вблизи ее оси. Гидрофобные взаимодействия между боковыми цепями этих остатков стабилизируют суперспираль. Обсуждение этого вопроса см. Schulz G. E., Schirmer R. H., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978, p. 79.

Глава 9

1. а) Каждым третьим остатком в каждой из цепей коллагена должен быть глицин, так как для более крупного по размеру аминокислотного остатка просто нет свободного пространства.
б) Температура плавления поли(Gly-Pro-Gly) ниже, чем температура плавления поли(Gly-Pro-Pro).
в) Нет. Глицин не занимает каждого третьего положения.

2. а) и б)
Стрелкой показана расщепляемая пептидная связь.



3. а) Дисульфиды.
б) Нет.
в) Пептидные связи между специфическими глутаминовыми и лизиновыми боковыми цепями.
г) Альдольная поперечная связь, гистидин-альдольная поперечная связь и лизилнорлейцин.
д) Альдольная поперечная связь, лизилнорлейцин и десмозин.

4. Декарбоксилирование α-оксоглутарата – это половина физиологической реакции. По-видимому, сначала α-оксоглутарат подвергается атаке со стороны кислорода и образуется перокси-кислота, которая далее вступает в реакцию с субстратом, содержащим пролин. Обсуждение этого опыта и его значение для биомеханики см. Counts D. F., Cardinale G. J., Udenfriend S., Proc. Nat. Acad. Sci., **75**, 2145 (1978).

Глава 10

1. $2{,}86 \cdot 10^6$ молекул.
2. Циклопропановое кольцо препятствует упорядоченной упаковке углеводородных цепей и тем самым повышает текучесть мембран.
3. $2 \cdot 10^{-7}$ см; $6{,}32 \cdot 10^{-6}$ см и $2 \cdot 10^{-4}$ см.
4. Радиус этой молекулы $3{,}08 \cdot 10^{-7}$ см и коэффициент диффузии $7{,}37 \cdot 10^{-9}$ $см^2/с$. Среднее расстояние за 1 мкс составит $1{,}72 \cdot 10^{-7}$ см; за 1 мс – $5{,}42 \cdot 10^{-6}$ см и за 1 с – $1{,}72 \cdot 10^{-4}$ см.
5. Первоначальное снижение амплитуды парамагнитного резонансного спектра обусловлено восстановлением спин-меченных фосфатидилхолинов в наружном слое бислоя. Аскорбат в условиях опыта не проходит через мембрану и потому не восстанавливает фосфолипиды внутреннего слоя. Медленное затухание остаточного спектра объясняется восстановлением фосфолипидов, поперечно диффундировавших в наружный слой.

Оглавление

Предисловие редактора перевода 5
Предисловие ко второму изданию 6
Предисловие к первому изданию 7
Глава 1. Молекулы и жизнь 9
1.1. Молекулярные модели 10
1.2. Пространство, время и энергия 11
1.3. Структура данной книги 13

Часть I. Конформация и динамика

Глава 2. Основные представления о структуре и функции белков 18
2.1. Белки построены из аминокислот 19
2.2. Особые аминокислоты дополняют основной набор, насчитывающий двадцать аминокислот 21
2.3. Аминокислоты, соединяясь пептидной связью, образуют полипептидные цепи 23
2.4. Белки состоят из одной или нескольких полипептидных цепей 24
2.5. Для очистки белков можно использовать множество различных методов 24
2.6. Последовательность аминокислот в белках уникальна и детерминируется генами 26
2.7. Экспериментальные методы определения последовательности аминокислот 27
2.8. Конформация полипептидных цепей 32
2.9. Периодичные структуры: альфа-спираль, бета-складчатый слой, спираль коллагена 34
2.10. Полипептидная цепь может поворачиваться на 180° благодаря образованию β-изгибов 37
2.11. Структурные уровни в архитектуре белков 37
2.12. Последовательность аминокислот определяет трехмерную структуру 38
2.13. Формирование свернутой молекулы белков происходит путем ассоциации α-спиралей и складчатых β-слоев 41
Заключение 42
Приложение. Понятия кислотности и основности 45
Вопросы и задачи 47
Глава 3. Переносчики кислорода – миоглобин и гемоглобин 48
3.1. Кислород присоединяется к простетической группе гема 48
3.2. Рентгеноструктурный анализ кристаллов выявляет пространственное расположение атомов 50
3.3. Этапы рентгеноструктурного анализа миоглобина 51
3.4. Структура миоглобина характеризуется компактностью и высокой степенью α-спирализованности 54
3.5. Участок связывания кислорода в миоглобине 56
3.6. Жесткое окружение гема обеспечивает обратимость оксигенирования 58
3.7. Присутствие дистального гистидина снижает связывание окиси углерода 60
3.8. В растворенном виде и в кристаллическом состоянии миоглобин имеет практически одинаковую структуру 60
3.9. Неполярные взаимодействия играют важную роль в стабилизировании конформации миоглобина 61
3.10. Развернутая молекула миоглобина спонтанно принимает функционально активную конфигурацию 62
3.11. Гемоглобин состоит из четырех полипептидных цепей 63
3.12. Рентгеноструктурный анализ гемоглобина 63
3.13. Четвертичная структура гемоглобина 64
3.14. α- и β-цепи гемоглобина очень сходны с миоглобином 64
3.15. Критически необходимые остатки в последовательности аминокислот 65
3.16. Возникновение гемоглобина – новый этап в эволюции 66
Заключение 66
Вопросы и задачи 68

Глава 4. Гемоглобин: аллостерический белок 69
4.1. Функциональные различия между миоглобином и гемоглобином 69
4.2. Кооперативность связывания кислорода гемоглобином 69
4.3. Кооперативное связывание кислорода гемоглобином увеличивает транспорт кислорода 72
4.4. H^+ и CO_2 способствуют высвобождению O_2 (эффект Бора) 72
4.5. Бисфосфоглицерат снижает сродство к кислороду 73
4.6. Клиническое значение бисфосфоглицерата 74
4.7. Гемоглобин плода характеризуется высоким сродством к кислороду 75
4.8. Для проявления аллостерического

эффекта необходимо взаимодействие субъединиц 75
4.9. Четвертичная структура гемоглобина значительно изменяется при оксигенировании 76
4.10. Солевые связи между отдельными цепями придают жесткость структуре дезоксигемоглобина 77
4.11. При оксигенировании атом железа перемещается в плоскость порфирина 77
4.12. Движение атома железа передается на другие субъединицы через проксимальный гистидин 79
4.13. Механизм кооперативного связывания кислорода 79
4.14. Бисфосфоглицерат снижает сродство к кислороду путем образования перекрестных связей с дезоксигемоглобином 80
4.15. CO_2 присоединяется к концевым аминогруппам гемоглобина, снижая его сродство к кислороду 81
4.16. Механизм эффекта Бора 81
4.17. Коммуникация внутри белковой молекулы 84
Заключение 84
Вопросы и задачи 85

Глава 5. Молекулярные болезни: серповидноклеточная анемия 88
5.1. Серповидноклеточная анемия – хроническая гемолитическая болезнь, передающаяся по наследству 89
5.2. Дезоксигенированный серповидноклеточный гемоглобин имеет пониженную растворимость 90
5.3. Гемоглобин S отличается от гемоглобина А по электрофоретической подвижности 90
5.4. Получение пептидных карт: выявление аминокислотной замены в гемоглобине серповидных клеток 92
5.5. В β-цепи произошла замена одной-единственной аминокислоты 93
5.6. На поверхности гемоглобина серповидных клеток имеются «липкие участки» 94
5.7. Дезоксигемоглобин S образует длинные спирализованные волокна 95
5.8. Скорость образования волокон в высокой степени зависит от концентрации дезоксигемоглобина S 95
5.9. Высокая частота гена серповидноклеточности обусловлена его защитным эффектом в отношении малярии 97
5.10. Стратегия поиска лекарственных средств для лечения серповидноклеточной анемии 97
5.11. Молекулярная патология гемоглобина 98
5.12. Гемоглобин М: продукт мутации в активном центре 99
5.13. Полярные группы в щели, занимаемой гемом, ослабляют его связывание с полипептидной цепью 99
5.14. В результате некоторых мутаций гемоглобины утрачивают стабильность из-за деформаций третичной структуры 99
5.15. Мутации в области контактов нарушают аллостерические взаимодействия 100
5.16. Значение открытия мутантных гемоглобинов 101
Заключение 101
Вопросы и задачи 102

Глава 6. Введение в энзимологию 104
6.1. Ферменты обладают огромной каталитической силой 104
6.2. Ферменты обладают высокой специфичностью 104
6.3. Активность некоторых ферментов регулируется 105
6.4. Ферменты осуществляют трансформацию различных видов энергии 106
6.5. Ферменты не сдвигают равновесия реакции 107
6.6. Ферменты снижают энергию активации катализируемых ими реакций 107
6.7. Первый этап ферментативного катализа – образование фермент-субстратного комплекса 108
6.8. Некоторые свойства активных центров 109
6.9. Кинетика многих ферментов описывается моделью Михаэлиса – Ментен 111
6.10. V_{max} и K_M можно определить, используя различные концентрации субстрата 112
6.11. Значение величин K_M и V_{max} 113
6.12. О степени совершенства кинетики ферментативного катализа судят по критерию $k_{кат}/K_M$ 114
6.13. Ферменты могут ингибироваться специфическими молекулами 114
6.14. Конкурентное и неконкурентное ингибирование различаются по кинетике 116
6.15. Лечение отравления этиленгликолем на основе конкурентного ингибирования 117

6.16. Аллостерические ферменты не подчиняются кинетике Михаэлиса–Ментен 118
6.17. Согласованный механизм аллостерических взаимодействий 118
6.18. Последовательный механизм аллостерического взаимодействия 121
6.19. Водородные связи, а также электростатические и вандерваальсовы взаимодействия в фермент-субстратных комплексах 122
6.20. Заряженные субстраты могут связываться с противоположно заряженными группами фермента 122
6.21. При связывании субстратов с ферментами образуются строго ориентированные водородные связи 122
6.22. Белки обладают выраженной способностью к образованию водородных связей 123
6.23. Вандерваальсовы взаимодействия играют важную роль в случаях стерической комплементарности 124
6.24. Биологически важные свойства воды: полярность воды и ее способность к когезии 125
6.25. Присутствие воды ослабляет полярные взаимодействия 126
6.26. Гидрофобные взаимодействия: в водной среде неполярные группы стремятся ассоциировать 127
Заключение 127
Вопросы и задачи 130

Глава 7. Механизм действия ферментов: лизоцим и карбоксипептидаза 132
7.1. Лизоцим расщепляет клеточные стенки бактерий 132
7.2. Трехмерная структура лизоцима 133
7.3. Поиски активного центра лизоцима 134
7.4. Способ связывания конкурентного ингибитора 136
7.5. От структуры фермента–к механизму ферментативного действия 136
7.6. Промежуточное образование иона карбония–критический этап катализа 140
7.7. Экспериментальное доказательство предложенного механизма ферментативного катализа 141
7.8. Карбоксипептидаза А: протеолитический фермент, содержащий цинк 144
7.9. Связывание субстрата индуцирует большие структурные изменения активного центра карбоксипептидазы А 146
7.10. Скорость катализа карбоксипептидазой А возрастает благодаря смещению электронов 148
Заключение 149
Вопросы и задачи 151

Глава 8. Активация проферментов: пищеварительные ферменты и факторы свертывания крови 152
8.1. Активация химотрипсиногена происходит путем специфического расщепления одной пептидной связи 152
8.2. Трехмерная структура химотрипсина 153
8.3. Химотрипсин специфичен в отношении ароматических и больших неполярных боковых цепей 154
8.4. При катализе химотрипсином часть субстрата ковалентно связывается с ферментом 154
8.5. Ацильная группа соединяется с необычайно реакционноспособным остатком серина на ферменте 156
8.6. Участие гистидина-57 в катализе выявляется с помощью аффинной метки 157
8.7. Система переноса заряда обеспечивает челночную передачу протона при катализе 158
8.8. В химотрипсине имеется глубокий карман для связывания ароматической боковой цепи 158
8.9. В процессе катализа образуется переходное тетраэдрическое промежуточное соединение 159
8.10. Механизм активации профермента 160
8.11. Трипсин и эластаза: вариации на тему 161
8.12. Ингибитор панкреатического трипсина прочно связывается в активном центре трипсина 162
8.13. Дивергентная и конвергентная эволюция сериновых протеиназ 163
8.14. Координированная активация панкреатических проферментов 165
8.15. Преждевременная активация проферментов может приводить к летальному исходу, в частности при панкреатите 165
8.16. Основные типы протеолитических ферментов–это сериновые протеиназы и карбоксипротеиназы 165
8.17. Свертывание крови как каскад реакций активации проферментов 166
8.18. Образование кровяного сгустка требует взаимодействия двух типов ферментативных превращений 167

8.19. Фибриноген превращается в фибриновый сгусток под действием тромбина 167
8.20. Мономеры фибрина спонтанно образуют фибриллы 168
8.21. Сгусток фибрина стабилизирован ковалентными поперечными связями 169
8.22. Тромбин гомологичен трипсину 169
8.24. На фосфолипидной поверхности тромбоцитов протромбин активируется фактором X_a 171
8.25. Гемофилия и другие формы нарушения свертывания крови позволили выявить ряд начальных этапов образования кровяного сгустка 172
8.26. Внутренний механизм свертывания крови 173
8.27. Внешний механизм свертывания крови 174
8.28. Контроль свертывания крови: проблема, требующая внимания 175
Заключение 176
Вопросы и задачи 177

Глава 9. Белки соединительной ткани: коллаген, эластин и протеогликаны 179
9.1. Тропоколлаген как основная структурная единица коллагена 179
9.2. Коллаген обладает необычным составом и необычной последовательностью аминокислот 180
9.3. Некоторые остатки пролина и лизина в коллагене гидроксилируются 180
9.4. К остаткам гидроксилизина присоединены сахара 182
9.5. Структура тропоколлагена – это тройной спирально скрученный тяж 182
9.6. Малые размеры глицина делают его незаменимым компонентом структуры 184
9.7. Стабильность спирали коллагена зависит от кооперативных взаимодействий 184
9.8. Нарушение гидроксилирования – один из биологических дефектов при цинге 186
9.9. Проколлаген – предшественник коллагена при его биосинтезе 187
9.10. Дополнительные пептиды цепей-предшественников отщепляются ферментативно 188
9.11. Коллагеновое волокно состоит из ступенчато расположенных молекул тропоколлагена 188
9.12. Образование коллагенового волокна регулируется проколлаген-пептидазами 189
9.13. Поперечные связи повышают прочность коллагенового волокна 190
9.14. Коллагеназы – ферменты, специфически расщепляющие коллаген 191
9.15. Эластин – каучукоподобный белок эластических волокон 192
9.16. Протеогликаны образуют основное вещество соединительной ткани 193
Заключение 195
Вопросы и задачи 198

Глава 10. Введение в проблему биологических мембран 199
10.1. Общие свойства биологических мембран 200
10.2. Фосфолипиды – основной класс мембранных липидов 201
10.3. В большинстве мембран имеются также гликолипиды и холестерол 203
10.4. Фосфолипиды и гликолипиды легко образуют бислои 204
10.5. Липидные бислои – нековалентные кооперативные структуры 205
10.6. Липидные бислои непроницаемы для ионов и многих полярных молекул 206
10.7. Большинство мембранных процессов опосредовано белками 208
10.8. Реконструкция функционирующих мембранных систем из очищенных компонентов 209
10.9. Отдельные белки мембран глубоко погружены в липидный бислой 210
10.110. В мембране эритроцитов содержатся различные периферические и интегральные белки 211
10.11. Мембрану эритроцита пронизывают канал для анионов и сложный белок гликофорин 213
10.12. Углеводные единицы расположены на наружной стороне плазматической мембраны 214
10.13. Липиды и многие мембранные белки быстро диффундируют в плоскости мембраны 215
10.14. Мембранные белки не перемещаются поперек бислоев 218
10.15. Жидкостно-мозаичная модель биологических мембран 219
10.16. Мембранам свойственна асимметрия 219
10.17. Текучесть мембран зависит от состава жирных кислот и содержания холестерола 219
10.18. Трехмерная модель мембран по данным электронной микроскопии 221
Заключение 222
Вопросы и задачи 223
Ответы на вопросы и задачи 225